

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
7. Juli 2005 (07.07.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2005/062051 A1**(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G01N 33/569**,  
33/92

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2004/002778

(22) Internationales Anmeldedatum:  
20. Dezember 2004 (20.12.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
103 60 844.3 20. Dezember 2003 (20.12.2003) DE(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **PROFOS AG** [DE/DE]; Josef-Engert-Str. 9, 93053  
Regensburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **MEYER, Roman**  
[DE/DE]; Rosenstr. 6, 92287 Schmidmühlen (DE).  
**SCHÜTZ, Michael** [DE/DE]; Jakob-Schmid-Str. 13,  
93138 Kareth-Lappersdorf (DE). **GRALLERT, Holger**  
[DE/DE]; Obere Bergstr. 16, 69198 Schriesheim (DE).  
**GRASSL, Renate** [DE/DE]; Gumpelzhaimer Str. 1,  
93049 Regensburg (DE). **MILLER, Stefan** [DE/DE];  
Holzgartenstr. 51, 93053 Regensburg (DE).(74) Anwälte: **BETTENHAUSEN, Berthold** usw.; Dehmel &  
Bettenhausen, Herzogspitalstr. 11, 80331 München (DE).(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,  
ZW.(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,  
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: ENDOTOXIN DETECTION METHOD

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON ENDOTOXIN

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting endotoxins in a sample.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Nachweis von Endotoxinen aus einer Probe.



WO 2005/062051 A1

### Verfahren zum Nachweis von Endotoxin

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Nachweis von Endotoxinen in einer Probe.

Endotoxin (ET) bezeichnet eine Familie von Lipopolysacchariden, die zusammen mit Proteinen und Phospholipiden die äußere Zellwand Gram-negativer Bakterien bilden. Endotoxine kommen ausschließlich in dieser Bakteriengruppe vor und spielen eine wichtige Rolle in der Organisation, Stabilität und Barrierefunktion der äußeren Membran. Zahlreiche Bakteriophagen nutzen Endotoxin bzw. allgemein Lipopolysaccharid zur spezifischen Erkennung ihrer Wirtsbakterien.

Alle Endotoxinvarianten bestehen aus einem Heteropolysaccharid, das kovalent an Lipid A gebunden ist. Lipid A verankert Endotoxin in der äußeren Bakterienmembran. Das Heteropolysaccharid, das aus einem Herzoligosaccharid und dem O-Antigen besteht, zeigt in die umgebende Lösung und bestimmt die serologische Identität des Bakteriums. Das O-Antigen besteht aus repetitiven Oligosaccharideinheiten, deren Zusammensetzung stammspezifisch ist. Charakteristische Bausteine des Herzoligosaccharids sind 2-Keto-3-desoxyoctonsäure (KDO) und L-Glycero-D-manno-heptose (Hep).

Der konservativste Teil von Endotoxin verschiedener Gattungen ist das Lipid A. Ähnlich konserviert wie Lipid A ist die innere Herzregion, die äußere Herzregion weist bereits eine höhere Variation auf. Die innere Herzregion, KDO und Lipid A selbst tragen mehrere Phosphatgruppen als Substituenten und sind so für die negative Ladung von Endotoxin verantwortlich. Darüber hinaus können die Phosphatgruppen am Lipid A und der Herzregion variabel mit Arabinose, Ethanolamin und Phosphat substituiert sein. Einzelne Saccharidbausteine des O-Antigens sind acetyliert, sialysiert oder glycosyliert. Das O-Antigen variiert außerdem bezüglich der Anzahl repetitiver Einheiten, weshalb die Endotoxin-Population jedes Bakteriums eine gewisse Heterogenität aufweist.

Endotoxine sind Biomoleküle, die ohne entsprechende Vorsichtsmaßnahmen in praktisch allen wässrigen Lösungen vorzufinden sind. Endotoxine können bei Mensch und Tier zu Sepsis, einer starken Fehlreaktion des Immunsystems führen. Daher sind z.B. bei der Herstellung von Pharmaproteinen Verunreinigungen mit Endotoxin exakt nachzuweisen und in der Folge

komplett zu entfernen. Endotoxin stellt ein Problem bei gentechnisch hergestellten Arzneimitteln, Gentherapeutika oder Substanzen dar, die in Mensch oder Tier (z.B. Tiermedizinische Behandlung oder bei Tierversuchen) injiziert werden. Doch nicht nur bei medizinischen, sondern auch bei Forschungsanwendungen, wie bei Transfektionsexperimenten von Säugerzellen kann eine Hemmung bzw. ein Senken der Transfektionseffizienz durch Endotoxin beobachtet werden.

Um Proteine im Rahmen von klinischen Studien einsetzen zu können, verlangen die europäische und die amerikanische Pharmacopeia, dass die Proteine bestimmte Grenzwerte an Endotoxinbelastung unterschreiten (z.B. Immuns Serum Globulin  $\leq 0,91$  EU/ml, dies entspricht  $\leq 5$  EU/kg Körpergewicht & Stunde (Dosis = EU/kg \* h); EU = Endotoxin Unit; FDA (Food and Drug Administration): Guideline on Validation of LAL as End Product). Falls ein Medikament bzw. darin enthaltene Proteine eine zu hohe Endotoxinbelastung aufweisen, kann dies bis zum Tod des Probanden führen. Die fehlgeleitete Immunabwehr schädigt durch eine Überreaktion den Patienten. Dies kann zu Gewebeentzündungen, Blutdruckabfall, Herzrasen, Thrombose, Schock etc. führen. Bereits eine länger anhaltende Endotoxin-Exposition in Picogramm-Mengen kann zu chronischen Nebenwirkungen wie z.B. Immunschwächen, septischen Symptomen etc. führen. Im Rahmen der Substanzherstellung wird daher, insbesondere bei Prozessen unter „Good Manufacturing Practice“ (GMP) Bedingungen, versucht, Endotoxin soweit wie möglich abzureichern. Allerdings ist die Endotoxin-Entfernung bei Proteinen, Polysacchariden und DNA problematisch. Gerade bei Proteinen gibt es große Probleme durch deren intrinsische Eigenschaften wie Ladungszustand oder Hydrophobizität, die eine Endotoxinentfernung nahezu verhindern bzw. zu großen Produktverlusten bei der Entfernungspozedur führen können.

Derzeit sind vier Verfahren zum Endotoxin-Nachweis in biologischen Lösungen beschrieben, wobei nur die beiden ersten Verfahren von der FDA zugelassen sind. 1. „Rabbit Pyrogen Testing“: Ein Verfahren, bei dem einem lebenden Kaninchen eine Endotoxin-Lösung injiziert und damit eine Immunreaktion ausgelöst wird. Diese Endotoxin-verursachte Immunantwort wird über die Entwicklung von Fieber nachgewiesen. 2. Deutlich besser standardisierbar ist der „Limulus Amoebocyte Lysate (LAL)“ – Test, der derzeit am häufigsten verwendete Test (BioWhittaker, Inc., Charles River, Inc., Associates of Cape Cod, Inc., alle USA). Bei diesem Verfahren wird die Verklumpung des Blutes des Pfeilschwanzkrebses (*Limulus polyphemus*) nach Endotoxin-Kontakt gemessen. 3. Der InVitro Pyrogen Test basiert auf dem Nachweis von Interleukin-1 $\beta$  in menschlichem Blut, das an der Fieberinduktion beteiligt ist. Der Test besteht

aus einem Inkubationsschritt von menschlichem Blut mit der zu untersuchenden Lösung und der anschließenden Detektion des Interleukins über Antikörper. 4. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz eines speziellen Zellkultursystems (Sterogene Inc., USA), mit dem die Aktivierung von Monozyten über die Entstehung bestimmter Zytokine verfolgt wird.

5

Die beiden erstgenannten Verfahren sind jedoch sehr teuer und durch den großen Bedarf an Versuchstieren bzw. an Blut des sehr seltenen Pfeilschwanzkrebses nicht zuletzt aus Tierschutzgründen bedenklich. Der LAL-Test kann zwar auch miniaturisiert und automatisiert werden, hat aber aufgrund geringer Stabilität der Komponenten massive Nachteile in der Anwendung. Eine einmal geöffnete LAL-Lösung muß direkt weiterverarbeitet und aufgebraucht werden, da die Komponenten innerhalb weniger Stunden aggregieren. Der InVitro Pyrogen Test benötigt möglichst frisches menschliches Blut und ist relativ zeitaufwändig, da die Produktion des Interleukins etwa 10 bis 24 Stunden benötigt. Neben Endotoxinen können mit dem Pyrogen Test auch andere Pyrogene erkannt werden. Dieser Test wird jedoch in erster Linie als Ersatz für den „Rabbit Pyrogen Test“ verwendet. Für alle Testverfahren ist geschultes Personal nötig und die Verfahren sind sehr störanfällig, weil z.B. das Immunsystem von Kaninchen auf die gleiche Endotoxindosis durchaus unterschiedlich reagieren kann. Das Zellkultur-Verfahren der Firma Sterogene ist, wie alle Zellkulturverfahren, ebenfalls sehr aufwändig und weist Probleme bei der Standardisierung auf.

20

Insgesamt kann festgestellt werden, dass es kein einfach handhabbares und kostengünstiges Verfahren zum Endotoxinnachweis gibt und die derzeit eingesetzten Methoden eine Reihe von Nachteilen aufweisen. Es besteht daher der Bedarf für ein Verfahren, das diese Nachteile umgeht.

25

Daher liegt der Erfindung die Aufgabe zu Grunde, ein Verfahren bereitzustellen, das Endotoxine schneller, einfacher und standardisierter in Lösungen und Proben nachweisen kann.

Die Aufgaben werden durch den in den Patentansprüchen definierten Gegenstand gelöst.

30

Die nachfolgenden Figuren erläutern die Erfindung.

Fig. 1 zeigt eine schematische Übersicht der chemischen Struktur von Endotoxin aus E. coli O111:B4. Hep = L-Glycero-D-manno-heptose; Gal = Galactose; Glc = Glucose; KDO = 2-Keto-

3-desoxyoctonsäure; NGa = N-Acetyl-galactosamin; NGc = N-Acetylglucosamin.

Figur 2 zeigt Ergebnisse von Oberflächen-Plasmon-Resonanz Messungen. (A) Resonanzkurven, die als Antwort auf Injektion von verschiedenen (je in  $\mu\text{g/ml}$ : 100; 25; 6,25; 4; 1,56; 0,4) p12-Konzentrationen ( ) gemessen wurden. Die Bindung erfolgt an Endotoxin von *E. coli* D21f1, das auf einem hydrophoben HPA-Chip immobilisiert wurde. Die Injektion von p12 und EDTA (5 mM) wird durch Balken über den Kurven markiert. Puffer: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0. (B) Gleichgewichtsresonanzwerte für die Bindung von p12 an immobilisiertes Endotoxin wurden etwa 600 s nach Beginn der p12 Injektion gemessen und gegen die dazugehörigen p12-Konzentration aufgetragen. Die durchgezogene Linie zeigt einen Fit der Langmuirschen Adsorptionsisotherme ( $RU = RU_{\text{max}} * [p12] / ([p12] + K_d)$ ) an die Daten. (C) Bindung von *E. coli* an biotinyliertes p12, das auf Streptavidin-Chips immobilisiert wurde. *E. coli* D21e8 ( ), dessen innerere Herz-Region vollständig ist, an p12. Dagegen bindet *E. coli* D21f2 (----), der eine stark verkürzte Herz-Region besitzt, nicht an p12. Die Messungen wurden in PBS durchgeführt.

Figur 3 zeigt schematisch die Struktur der Endotoxin-Herzregion verschiedener *E.coli*-Mutanten.

Figur 4 zeigt in einem Balkendiagramm das Bindungsverhalten des Bakteriophagenschwanzproteins p12 an Endotoxin, das mittels Polymyxin B an Chromatographiesäulen (0.5 ml) gebunden worden war. Es wurden jeweils 2 Polymyxin B Säulen mit Endotoxin von *E. coli* O55:B5 ( $10^6$  EU/ml) gespült (+LPS, schwarze Balken) und 2 Säulen mit Wasser gewaschen (- LPS, gestreifte Balken). Die Menge des Bakteriophagenschwanzproteins p12 wurde gegen die Fraktionen des Chromatographielaufs aufgetragen. Jeder Balken zeigt die Mittelwerte, die aus zwei parallelen Chromatographieläufen ermittelt wurden. Der erste Balkenpaar (A) zeigt die aufgetragene p12 Menge und das zweite die Fraktion 1 (F1), eine Kontrollfraktion vor dem Auftrag von p12 auf die Säule. Der Pfeil markiert den Auftrag von p12 auf die Säule. Die Fraktionen 2 – 5 wurden nach dem Auftrag gesammelt. Die Konzentration von p12 wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm ermittelt. Das Fraktionsvolumen für die Fraktionen 1-4 betrug 1 ml und 2 ml für Fraktion 5. Die Regeneration der Säule in Fraktion 5 erfolgte durch Zugabe von 2 mM EDTA zum Laufpuffer (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,5). Das Bakteriophagenschwanzprotein p12 wurde auf den Säulen, die vorher mit Endotoxin beladen worden waren, zurückgehalten, während es durch die Säulen, die kein Endotoxin enthielten, ohne Verzögerung durchlief.

Figur 5 A und B zeigt in einer Graphik die Abnahme der Fluoreszenz der T4p12-Mutante W359\_283Y nach Zugabe von Endotoxin-Polysaccharid (aus *Salmonella thyphimurium*). A) Die Fluoreszenz der p12-Mutante W359\_283Y (40 µg/ml) im Bereich von 305-450 nm wurde nach Anregung bei 295 nm gemessen. Nach Zugabe von 3 µl Polysaccharid (10 mg/ml) (graue Kurve), zu 120 µl Lösung mit p12-Mutante W359\_283Y konnte im Vergleich zur unbehandelten Probe (schwarze Kurve) eine Abnahme der Fluoreszenz beobachtet werden. Die Kurven wurden gegen Kontrollmessungen ohne die p12 Mutante korrigiert. Figur B) zeigt die prozentuale Abnahme der Fluoreszenz der p12 Mutante W359\_283Y in Abhängigkeit von der Konzentration des applizierten Endotoxin-Polysaccharids. Die Anregungswellenlänge war 295 nm und die Emissionswellenlänge 350 nm. Es wurde die p12 Mutante W359\_283Y (200 µg/ml oder 3.6 µM) vorgelegt und mit Endotoxin-Polysaccharid titriert. Auf der X-Achse sind die Endkonzentrationen des Endotoxin-Polysaccharids aufgetragen. Die Messwerte wurden gegen Kontrollmessungen ohne die p12 Mutante W359\_283Y korrigiert. Ab einer Polysaccharidkonzentration von 500 nM konnte eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz gemessen werden.

Figur 6 zeigt die Bindung eines anti-Lipid A Antikörpers an Lipopolysaccharid das über T4p12 auf einer Oberfläche gebunden ist. Die Bindung wurde durch Messung des Oberflächen-Plasmon-Resonanz Signals mit einem Biacore J beobachtet. Zunächst wurde T4p12 auf einer Durchflusszelle (CM-5 Chip von Biacore) über primäre Aminogruppen entsprechend den Vorschriften des Herstellers kovalent immobilisiert. Anschließend wurde Lipopolysaccharid von *E. coli* O55:B5 (LPS, 0.1 mg/ml) injiziert. Die Injektionsphasen sind durch Balken über der Messkurve markiert. Die Zunahme des Resonanzsignals zeigt die Bindung von Lipopolysaccharid an T4p12. Auch nach Beendigung der Injektion bleibt das Resonanzsignal erhöht und damit das Lipopolysaccharid an die Oberfläche gebunden. Anschließend wurde drei mal ein Antikörper (AK) gegen Lipopolysaccharide injiziert (2 µg/ml, polyklonaler Antikörper gegen Lipid A von Accurate Chemical & Scientific Corporation). Die Zunahme des Resonanzsignals bei jeder Injektion zeigt die Bindung des Antikörpers. Durch Zugabe von EDTA (EDTA) konnte die Bindung von Lipopolysaccharid an T4p12 gelöst werden. Das Resonanzsignal kehrt auf das Ausgangsniveau zurück. Eine zweite Durchflusszelle blieb unbehandelt und diente als Referenz. Die dargestellte Kurve zeigt die Differenz des Signals von der Messzelle und der Referenzzelle.

Figur 7 zeigt einen Vergleich verschiedener p12 Bakteriophagenschwanzproteine auf

Aminosäureebene. Die Proteine stammen von Phagen der Myoviridae-Familie und besitzen eine Homologie von mindestens 60% zu T4p12. Die für den Vergleich verwendeten p12 Proteine stammen von den Phagen T2 (NCBI-Datenbank Accession Nr: CAA39905; SEQ ID NO:9), T4 (AAD42417; SEQ ID NO:10), PP01 (BAD20635; SEQ ID NO:11), RB69 (AAP76072; SEQ ID NO:12) und AR1 (AAN03609; SEQ ID NO:13). Proteine der Phagen K3 (Burda M.R. et al., Biol. Chem. (2000) 381, 225-258), RB32-33 und Ox2 weisen eine ähnliche Homologie zu den oben genannten Phagen auf.

Der Begriff "Probenmaterial" oder "Probe" wie hier verwendet umfasst sämtliche Lösungen, in denen Endotoxine nachgewiesen werden sollen. Beispielhaft für Lösungen ist die folgende Aufzählung: wässrige Lösungen und Gemische aus Wasser und organischen Lösungsmitteln, Blut, Blutprodukte, Plasma, Serum, Urin, Medien. Beispielhafte Lösungen sind ferner solche, in denen feste zu untersuchende oder zu reinigende niedermolekulare und/oder hochmolekulare Substanzen gelöst wurden, beispielsweise, Zucker, Salze, Antibiotika, Proteine, DNA, RNA, Lebensmittel, Arzneimittel, Impfstoffe, oder organische und anorganische Chemikalien wie z.B. NaCl, MgCl<sub>2</sub>, Purine oder Pyrimidine.

Der Begriff "Endotoxin" wie hier verwendet bezeichnet das bakterielle Lipopolysaccharid, das Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien ist. Endotoxin bezeichnet nicht nur das vollständige Lipopolysaccharid sondern auch die einzelnen Bestandteile z.B. das Lipid A, die innere oder äußere Herzregion.

Der Begriff "Bakteriophagenschwanzprotein" wie hier verwendet bezeichnet solche Proteine, die in Bakteriophagen vorkommen und Endotoxine binden können. Üblicherweise sind diese Proteine im Bakteriophagenschwanz lokalisiert, können jedoch auch auf dem Bakteriophagenkopf oder bei Bakteriophagen ohne Schwanz auf der normalen Bakteriophagenhülle lokalisiert sein. Der Begriff Bakteriophagenschwanzprotein umfasst sowohl kurze als auch lange Bakteriophagenschwanzproteine. So können Bakteriophagen mit einer Basisplatte (z.B. Myoviridae wie T4-ähnliche Phagen) unterschiedliche Bakteriophagenschwanzproteine, so genannte lange oder kurze Bakteriophagenschwanzproteine aufweisen, die auch unterschiedliche Spezifität für Strukturen von Bakterienmembranen besitzen.

Der hier verwendete Begriff „Homologie“ bezeichnet eine signifikante Ähnlichkeit einer

Aminosäuresequenz zu einer Vergleichssequenz oder Teilen davon. Die Homologie einer Sequenz wird unter Zuhilfenahme des Similaritätsalgorithmus BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, Altschul et al., *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410 (1990) bestimmt. Als signifikant ähnlich werden, wie hier verwendet, Sequenzen bezeichnet, die eine Homologie von mindestens 60% aufweisen oder die z.B. unter Verwendung von Standardparametern im BLAST-Service des NCBI ein Signifikanzniveau (E-Value oder Probability) von  $P < 10^{-5}$  aufweisen, wenn Sie mit den Vergleichssequenzen verglichen werden.

Der Begriff "unspezifische Immobilisierung" oder "ungerichtete Immobilisierung" wie hier verwendet bedeutet, dass die Kopplung eines Proteins an eine Oberfläche über Proteinreste (z.B. primäre Amine) erfolgt, die über die gesamte Proteinoberfläche verteilt sein können. Die Auswahl der für die Kopplung des einzelnen Proteinmoleküls verwendeten Gruppe ist zufällig.

Der Begriff "Oberfläche" oder "Träger" wie hier verwendet umfasst alle Materialien, an die eine Kopplung oder Adhäsion eines Proteinmoleküls möglich ist, wie z.B. Glasoberflächen, Chromatographiematerialien, z.B. Agarose oder Sepharose, Plastikoberflächen, z.B. Polystyrol oder Polypropylen, Filtermaterialien, z.B. Cellulose,.

Der Begriff "gerichtete Immobilisierung" wie hier verwendet bedeutet, dass die Kopplung über Aminosäurereste oder andere Reste (z.B. Glykosylierungen des Proteins) erfolgt, deren Position im Protein (z. B. N- oder C-terminal) bekannt ist. Die Auswahl dieser Gruppen für die Kopplung erfolgt durch die Auswahl geeigneter Reaktionspartner/Linker, die bevorzugt mit diesen Resten reagieren (z.B. Kopplung von Sulfhydrylresten an Iodoacetatreste; Iodoacetat reagiert tausendmal schneller mit Sulfhydrylresten als mit Aminoresten).

Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Endotoxin, umfassend die Schritte:

- a) Inkubieren einer Probe mit Bakteriophagenschwanzproteinen, und anschließend
- b) Nachweis von an Bakteriophagenschwanzproteine gebundenem Endotoxin mittels spektroskopischer Verfahren, ELISA, chemischer oder enzymatischer Nachweisreaktion von Endotoxinen oder abgespaltenen Endotoxinkomponenten, oder mittels Kapazitätsmessung.

Gegebenenfalls wird nach Schritt a) und vor Schritt b) ein zusätzlicher Schritt a') Abtrennung von Bakteriophagenschwanzprotein-Endotoxin-Komplex von der Probe eingeführt.



Der Nachweis mittels spektroskopischer Verfahren kann z.B. mit Fluoreszenzemission, Fluoreszenzpolarisation, Absorption oder Circular dichroismus, der Nachweis mittels Kapazitätsmessung kann z.B. mittels elektrischer Signale durchgeführt werden. Die aufgeführten  
5 Nachweise können ferner mit einem Kompetitionsnachweis kombiniert werden.

Vorzugsweise betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren, bei dem nach Abtrennung des in Schritt a) gebildeten Bakteriophagenschwanzprotein-Endotoxin-Komplexes von der Probe, der Nachweis der Endotoxine über immunologische, chemische oder enzymatische Reaktionen  
10 erfolgt. Dazu können die Bakteriophagenschwanzproteine mit Hilfe spezieller Liganden, wie z.B. Biotin, Strep-Tag oder His-Tag, an die entsprechenden Träger z.B. Sepharosen oder magnetische Beads, die mit Streptavidin oder Streptactin beschichtet sind, gebunden werden. Anschließend kann, falls gewünscht, eine Abtrennung der grobkörnigen Träger durch Filtration, Zentrifugation oder magnetische Separation von der Probe erfolgen. Gewünscht ist die  
15 Abtrennung insbesondere, wenn die der Bakteriophagenschwanzprotein-Endotoxin-Komplex auf einer Oberfläche fixiert ist, die in den verwendeten Nachweisen nicht eingesetzt werden kann.

Der immunologische Nachweis erfolgt z.B. über die Bindung von Endotoxin spezifischen Antikörpern an die Endotoxine, Bindung eines Sekundärantikörpers an den ersten Antikörper  
20 und anschließender Detektion über eine enzymatische Reaktion, die durch ein an den Sekundärantikörper fusioniertes Enzym katalysiert wird (ELISA).

Der Endotoxin-Nachweis kann auch nach chemischer Spaltung des Endotoxins mittels Säure oder Base und anschließender Detektion einzelner Endotoxinbestandteile, wie der 2-Keto-  
25 Deoxyoctonsäure, den Heptosen (Lee C.-H., Tsai C.-M., Analytical Biochemistry, 1999; 267: 161-168) oder den Hydroxy-Fettsäuren (Lyngby J., Olsen L.H., Eidem T. Lundanes E. Jantzen E., Biologics, 2002; 30: 7-13) erfolgen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von  
30 Endotoxin, umfassend die Schritte:

- a) In Kontakt bringen einer Probe enthaltend Endotoxine mit einem Träger, anschließend
- b) Inkubieren von Bakteriophagenschwanzproteinen an die auf dem Träger immobilisierten Endotoxin, und
- c) Nachweis der Bakteriophagenschwanzproteine mittels spektroskopischer Verfahren, ELISA,

chemischer oder enzymatischer Nachweisreaktion von Endotoxinen oder abgespaltenen Endotoxinkomponenten, oder mittels Kapazitätsmessung.

- Gegebenenfalls wird nach Schritt b) ein weiterer Schritt b') Abtrennen der gebundenen  
5 Bakteriophagenschwanzproteine vom Endotoxin, durchgeführt.

Insbesondere bevorzugt sind die p12 Proteine der Phagen K3, T2, T4, Ox2, RB32-33, AR1, PP01 oder RB69.

- 10 Bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem nach der Bindung von Endotoxin an eine Oberfläche, die endotoxinbindende Liganden, wie Polymyxin B, Poly-L-Lysin, Chitosan und ähnliche tragen, Bakteriophagenschwanzproteine an die immobilisierten Endotoxine binden und diese Bakteriophagenschwanzproteine über eine anschließende Enzymreaktion nachgewiesen werden. Die Bakteriophagenschwanzproteine können mittels ELISA nachgewiesen werden, der  
15 spezifisch für das Bakteriophagenschwanzprotein ist, oder über Enzyme, die mit dem Bakteriophagenschwanzprotein gentechnisch fusioniert oder über chemische Reaktionen gebunden wurden. Bei den Enzymen handelt es sich z.B. um Alkalische Phosphatase, Peroxidase, oder andere.

20

- Vorzugsweise wird vor dem Inkubationsschritt der erfindungsgemäßen Verfahren die Ionenzusammensetzung der zweiwertigen Ionen z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und/oder der pH-Wert eingestellt, um eine optimale Endotoxin-Bakteriophagenschwanzprotein-Bindung zu erhalten. Ferner bevorzugt wird bei oder nach der Inkubation eine „Demaskierung“ des gebundenen  
25 Endotoxins durch Zugabe von Detergentien und/oder Salzen, z.B. Tween, Triton, NaCl oder Ammoniumsulfat, oder anderer Substanzen, z.B. Chitosan, Zucker oder Lipide, die ein Ablösen der Endotoxine von z.B. Proteinen oder Nukleinsäuren beschleunigen.

- Das für den Nachweis von Endotoxin verwendete Bakteriophagenschwanzprotein kann ein  
30 natürlicherweise vorkommendes oder ein molekularbiologisch oder biochemisch modifiziertes sein. Insbesondere bevorzugt sind Bakteriophagenproteine, die an sehr konservierte Bereiche von Endotoxin, nämlich an die Herzregion des LPS oder an Lipid A binden. Insbesondere bevorzugt sind die kurzen Bakteriophagenschwanzproteine vorzugsweise von Myoviridae-Phagen. Es können jedoch auch die Endotoxin-bindenden Proteine eines Bakteriophagenkopfes

oder der normalen Bakteriophagenhülle von Bakteriophagen ohne Schwanz verwendet werden. Ganz besonders bevorzugt sind Bakteriophagenschwanzproteine mit einer Homologie von mindestens 60% auf Aminosäureebene zu dem p12 Protein von T4. Das Bakteriophagenschwanzprotein kann aus verschiedenen Gründen gentechnisch und/oder biochemisch modifiziert sein. Für die erfindungsgemäßen Verfahren können jedoch nicht nur die natürlicherweise vorkommenden Bakteriophagenschwanzproteine verwendet werden, sondern auch deren Varianten. Varianten bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung, dass die Bakteriophagenschwanzproteine eine veränderte Aminosäuresequenz aufweisen. Diese können durch Screening der natürlich auftretenden Varianten, oder durch Zufalls-Mutagenese oder gezielte Mutagenese, aber auch durch chemische Modifikation erhalten werden. Die für die erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Bakteriophagenschwanzproteine können durch eine gezielte oder zufällige Mutagenese in ihrer Spezifität bzw. ihren Bindungseigenschaften an Trägerstrukturen angepaßt werden. Diese Bindung an die Träger kann fest, z.B. kovalent oder über eine spezifische oder unspezifische Biotinylierung erfolgen, aber auch reversibel z.B. über eine reduzierbare Disulfidbrücke. Ferner kann durch eine Modifikation die Stabilität erhöht werden. Durch die molekularbiologische oder chemische Mutagenese werden Mutationen eingeführt, die Aminosäureadditionen, -deletionen, -substitutionen oder chemische Modifikationen sein können. Diese Mutationen können eine Veränderung der Aminosäuresequenz in der Bindungsregion der Bakteriophagenschwanzproteine bewirken, mit dem Ziel, Spezifität und Bindungsaffinität an Testbedürfnisse anzupassen, z.B. die Bindung der Endotoxine an die Bakteriophagenschwanzproteine zu erhöhen oder irreversibel zu machen, um den Nachweis zu verbessern. Darüber hinaus kann eine gentechnische oder biochemische Modifikation der Phagenproteine durchgeführt werden, mit dem Ziel, die gegebenenfalls vorhandene enzymatische Aktivität auszuschalten, um dadurch die Bindung zu verbessern oder irreversibel zu machen. Weiterhin kann eine gentechnische oder chemische Modifikation der Phagenproteine durchgeführt werden, um die vorhandenen physikalischen Eigenschaften des Proteins wie Löslichkeit Thermostabilität usw. im Sinne des erfindungsgemäßen Verfahrens anzupassen.

Außerdem kann eine Verknüpfung der Bakteriophagenschwanzproteine mit enzymatisch wirksamen Proteinen erfolgen, um die Bakterienschwanzproteine sensitiver nachweisen zu können. Enzymatisch wirksame Proteine wie Alkalische Phosphatase oder Meerrettich Peroxidase, für die es kommerzielle Substrate gibt, können mittels chemischer Kopplungsmethoden oder über gentechnologische Fusion mit den

Bakteriophagenschwanzproteinen verknüpft werden. Die enzymatische Reaktion, die über diese Proteine eingeführt wird, erhöht die Sensitivität des Nachweises deutlich.

Arbeiten zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von T4 p12 haben gezeigt, dass bei erhöhter Temperatur proteolytische Fragmente von 33 kDa und 45 kDa erzeugt werden können, die N- und C-terminal (33 kDa) bzw. nur N-terminal (45 kDa) verkürzt sind. Im Gegensatz zu dem 33kDa Fragment ist das 45kDa Fragment noch in der Lage an Bakterien zu binden (Thomassen, E., et al., Mol. Biol.; 331: 361-373, 2003). Demzufolge ist der C-Terminus an der Zellbindung beteiligt. Daher kann durch eine N-terminale Modifikation eine gerichtete Bindung an Oberflächen durchgeführt werden und somit letztendlich die Bindung von Endotoxin indirekt optimiert werden. Darüberhinaus ist eine direkte Optimierung der Endotoxin-Bindung möglich.

Die Modifikation kann ferner insbesondere den Zweck haben, einen direkten Nachweis z.B. mittels Messung der Tryptophanfluoreszenz zu ermöglichen. Beispielsweise besitzt T4 p12 fünf Tryptophan-Reste. Das Fluoreszenzspektrum des nativen Proteins deutet darauf hin, dass diese Reste weitestgehend lösungsmittel-unzugänglich sind. Aus einer Vielzahl von wissenschaftlichen Arbeiten ist bekannt, dass fast immer aromatische Aminosäuren an der Bindung von Zuckerresten, wie sie auch in Endotoxin vorkommen, beteiligt sind. Die Bindung der Zuckerreste an Proteine kann durch einen Quench der Tryptophanfluoreszenz, bzw. gegebenenfalls auch zusätzlich durch eine Veränderung des Fluoreszenzmaximums verfolgt werden. Eigene Arbeiten lassen vermuten, dass die ungünstige Verteilung der Fluorophore des natürlichen p12 eine Ausnutzung der Fluoreszenz-Eigenschaften von p12 zur Bindungsmessung verhindert. Die Fluoreszenzeigenschaften von p12 werden durch die fünf Tryptophanreste dominiert, deren Fluoreszenz durch die Zugabe von Endotoxin nicht messbar verändert wird. Diese Daten lassen erwarten, dass eher Tyrosinreste als Tryptophanreste an der Bindung beteiligt sind, deren Signaländerung vor dem hohen Tryptophan-Hintergrund nicht sichtbar gemacht werden kann. Auf der Basis der Proteolyseergebnisse kommen sechs Tyrosine am C-Terminus von p12 für den Endotoxin-Nachweiskit in Frage, die entsprechend „sichtbar“ gemacht werden können. Durch einen selektiven molekularbiologischen Austausch der fünf Tryptophan-Reste gegen Tyrosine werden in einem ersten Schritt die spektroskopischen Eigenschaften so gezielt verändert, dass die Endotoxin-Bindung per Fluoreszenzsignaländerung eines einzelnen Tryptophanrestes messbar ist. Anschließend wird durch einen gezielten Austausch von jeweils einem der sechs Tyrosine im C-terminalen Bereich gegen einen Tryptophanrest die Intensität des messbaren Signals signifikant erhöht, um für die Entwicklung eines Endotoxin-Nachweiskits

attraktive Signalunterschiede zu erhalten. Wie für das p12 Protein von T4 gezeigt, können auch andere kurze Bakteriophagenschwanzproteine wie z.B. solche aus Myoviridae Phagen wie T4, T2, K3, Ox2, RB32-33 oder RB69 entsprechend modifiziert werden. Auch hier können jedoch ebenfalls die Endotoxin-bindenden Proteine eines Bakteriophagenkopfes oder der normalen  
5 Bakteriophagenhülle von Bakteriophagen ohne Schwanz verwendet werden, insbesondere von PhiX 174.

Welche Bakteriophagenschwanzproteine verwendet werden, hängt davon ab, welche Endotoxine nachgewiesen werden sollen. Bereits jetzt steht eine große Zahl bekannter Bakteriophagen für  
10 einen Großteil der bisher beschriebenen Bakterien zur Verfügung und kann für die erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden. Die Phagen und die entsprechenden Wirtsbakterien sind u.a. bei folgenden Stammsammlungen erhältlich: ATCC (USA), DSMZ (Deutschland), UKNCC (Großbritannien), NCCB (Niederlande) und MAFF (Japan); oder können durch mikrobiologische Standardmethoden aus Umweltproben isoliert werden.  
15 Bakteriophagenproteine können aus der Familie der Myoviridae kommen, also kurze Schwanzproteine sein, insbesondere aus der Gruppe der Pseudo-T-even, Schizo-T-Even oder der T-Even Phagen. Vorzugsweise werden für den erfindungsgemäßen Nachweis die kurzen Bakteriophagenschwanzproteine der Phagen K3, T2, T4, Ox2, RB32-33, AR1, PP01 und RB69 oder die Endotoxin-bindenden Proteine der Bakteriophagen ohne Schwanz z.B. von PhiX 174  
20 verwendet.

Vorzugsweise stammen die Bakteriophagenschwanzproteine für die erfindungsgemäßen Verfahren von Bakteriophagen, deren Wirtsbakterien medizinisch oder biotechnologisch relevante Bedeutung haben, wie z.B. E. coli, das bei der Produktion rekombinanter Proteine oder  
25 von Nukleinsäuren für die Gentherapie verwendet wird. Besonders bevorzugt sind Bakteriophagenschwanzproteine, die stark konservierte Bereiche von Endotoxin binden, wie z.B. die Herzregion oder Lipid A. Insbesondere bevorzugt sind T4p12 und T4p12-ähnliche Bakteriophagenschwanzproteine, z.B. T2-p12, K3-p12 (Burda-MR, Hindennach-I, Miller-S, Biol. Chem. 2000; 381: 255-258). Bei einer Kombination von Endotoxin-Verunreinigungen aus  
30 verschiedenen Wirtsbakterien kann für die erfindungsgemäßen Nachweise oder Abreicherungen eine Kombination der entsprechenden Endotoxin-erkennenden Bakteriophagenschwanzproteine eingesetzt werden.

Der Nachweis von Endotoxin in oder aus einer Probe erfolgt über die Bindung von Endotoxin an

die Bakteriophagenschwanzproteine. Diese Bindung kann z.B. durch direkte Messung mittels spektroskopischer Verfahren, z.B. über Fluoreszenzemission, Fluoreszenzpolarisation, Absorption oder Circular dichroismus nachgewiesen werden. Darüber hinaus kann die Bindung durch elektrische Signale, z.B. eine Kapazitätsmessung sichtbar gemacht werden. Weiterhin  
5 kann die Bindung von Endotoxin an die Bakteriophagenschwanzproteine auch indirekt über Verdrängungsexperimente nachgewiesen werden.

Außerdem kann die Bindung von Bakteriophagenschwanzproteinen an Endotoxin nachgewiesen werden, indem die Endotoxine zunächst über andere endotoxinbindende Substanzen oder auch  
10 über ein zweites Bakteriophagenschwanzprotein auf einer Oberfläche immobilisiert werden, und anschließend ein anderes Bakteriophagenschwanzprotein an Endotoxin bindet. Nach dem Auswaschen von überschüssigem Bakteriophagenschwanzprotein wird anschließend die Menge des gebundenen anderen Bakteriophagenschwanzproteins quantifiziert. Dies erfolgt entweder über Antikörper gegen das andere Bakteriophagenschwanzprotein (ein sog. ELISA), oder über  
15 eine enzymatische Reaktion, die durch ein Protein katalysiert wird, das an das andere Bakteriophagenschwanzproteine fusionierte ist. Die Oberfläche kann dazu vorher mit Endotoxin bindenden Substanzen, wie z.B. Polymyxin B, Histidin, Histamin, Poly-L-Lysin, DEAE, Polyethylenimin, Deoxycholsäure, Poly  $\gamma$ -aminomethyl-L-glutamin, Poly Vinylalkohol, Poly-N,N-dimethylaminopropylacrylamid, Dextran, Chitosan, und ähnliche beschichtet werden.  
20 Außerdem kann auch ein Bakteriophagenschwanzprotein für die Immobilisierung von Endotoxin verwendet werden. Der Nachweis von Endotoxin erfolgt dann mit einem zweiten Bakteriophagenschwanzprotein, das andere Endotoxin Bindungseigenschaften besitzt als das für die Immobilisierung benutzte Bakteriophagenschwanzprotein. Die Immobilisierung der Endotoxin bindenden Substanzen erfolgt dabei entweder durch Adhäsion, kovalente Kopplung,  
25 oder Bindung über spezielle Immobilisierungsgruppen, wie Biotin, Streptavidin, Strep-Tag, His-Tag, und vergleichbare Gruppen. Der Nachweis des Bakteriophagenschwanzproteins kann auch nach Ablösen des Proteins von der Oberfläche erfolgen.

Für die erfindungsgemäßen Nachweise können die Bakteriophagenschwanzproteine bei Bedarf  
30 einer Abtrennung der Bakteriophagenschwanzprotein-Endotoxin-Komplexe von der Probe auf geeigneten Oberflächen, z.B. Magnetpartikeln, Sepharosepartikeln, Agarosepartikeln, Mikrotiterplatten, Filtermaterialien oder Durchflußzellkammern, gekoppelt werden (indirekter Nachweis). Die Trägerstrukturen können z.B. aus Polystyrol, Polypropylen, Polycarbonat, PMMA, Celluloseacetat, Nitrozellulose, Glas, Silizium oder Agarose bestehen. Die Kopplung

kann z.B. durch Adsorption oder kovalente Bindung erreicht werden.

Wichtig hierbei ist eine funktionelle Kopplung, d.h. Bakteriophagenschwanzproteine verfügen trotz Bindung an das Trägermaterial über für Endotoxin zugängliche Strukturen bzw. Bindestellen. Die Kopplung der Bakteriophagenschwanzproteine kann unspezifisch, oder aber bevorzugt gerichtet, über z.B. eine selektive Biotinylierung, oder gekoppelt über einen Spacer oder Linker erfolgen.

Dazu können die Bakteriophagenschwanzproteine mit niedermolekularen Substanzen z.B. Biotin verknüpft sein, um über diese niedermolekularen Substanzen an Polypeptide z. B. Streptavidin zu binden, die ihrerseits auf dem Träger immobilisiert wurden. Statt Biotin kann ferner der sogenannte Strep-Tag (Skerra, A. & Schmidt, T. G. M. Biomolecular Engineering 16 (1999), 79-86) verwendet werden, der eine kurze Aminosäuresequenz ist und an Streptavidin bindet. Ferner kann der His-Tag verwendet werden, der über zweiwertige Ionen (Zink oder Nickel) oder einen für ihn spezifischen Antikörper (Qiagen GmbH, Hilden) an ein Trägermaterial binden kann. Der Strep-Tag sowie der His-Tag wird vorzugsweise über DNA-Rekombinationstechnologie an die rekombinant hergestellten Bakteriophagenproteine gebunden. Diese Kopplung kann gerichtet, z.B. am N- oder C-Terminus oder an anderen Positionen im Bakteriophagenschwanzprotein erfolgen. Die gerichtete Kopplung erfolgt über eine geeignete, reaktive natürlicherweise bei Phagenproteinen nicht häufig oberflächenexponierte Aminosäure wie Cystein, das an geeigneter Stelle gezielt eingeführt wurde. Da Phagenschwanzproteine im Cytoplasma synthetisiert werden, ist nicht mit Disulfidbrücken zu rechnen. Vorzugsweise kann auch über andere Aminosäuren direkt, oder wie auch bei Cystein über einen „Spacer“ oder „CrossLinker“ (monofunktionell oder bifunktionell) indirekt gekoppelt werden.

Bei der Cysteinkopplung sind alle bifunktionellen Crosslinker mit NH- und SH-reaktiven Gruppen, mit und ohne Zwischenspacer, z.B. 11-Maleimidoundecanoic acid sulfo-NHS oder Succinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]-cyclohexane-1-carboxy-[6-amido]caproate möglich. Sofern keine Spacer vorhanden sind, können 8-12 C-Atom-Spacer mit endständiger NH-Gruppe eingefügt werden. Vorzugsweise erfolgt die Cysteinkopplung über eine spezifische Biotinylierung des Cysteins durch z.B. EZ-Link-PEO-Maleimide activated Biotin (Pierce).

Zweiwertige Ionen z.B.  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  sind für eine Bindung von Endotoxinen an Bakteriophagenschwanzproteine wie p12 von T4 oder die kurzen Schwanzfaserproteine der Phagen K3, T2, Ox2, RB32-33, AR1, PP01 oder RB69 wichtig. Durch Zugabe von geeigneten

Chelatoren, wie z.B. EDTA oder EGTA, kann diese Bindung jedoch gelöst werden. Bevorzugt für die Bindung sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im Bereich von etwa 0,1  $\mu\text{M}$  bis etwa 100 mM, besonders bevorzugt im Bereich von etwa 0,1  $\mu\text{M}$  bis etwa 10 mM, insbesondere bevorzugt im Bereich von etwa 0,1  $\mu\text{M}$  bis etwa 1 mM und ferner insbesondere bevorzugt im Bereich von etwa 10  $\mu\text{M}$  bis 1 mM. Ferner bevorzugt für die Bindung sind  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen im Bereich von etwa 0,1  $\mu\text{M}$  bis etwa 10 mM, besonders bevorzugt im Bereich von etwa 0,1  $\mu\text{M}$  bis etwa 1 mM, insbesondere bevorzugt im Bereich von etwa 10  $\mu\text{M}$  bis 1 mM. Erniedrigt man die Konzentration zweiwertiger Ionen durch Zugabe von 1 mM EDTA unter 100 nM, so wird die Bindung von Endotoxin an p12 gelöst.  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen über 10 mM verschlechtern die Bindung von Endotoxin an p12, was sich in einer Erhöhung der Dissoziationskonstante bemerkbar macht. Ohne Zugabe von  $\text{Mg}^{2+}$  ergibt sich ein  $K_d$ -Wert von 50 nM und in einem Puffer mit 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  wurde ein  $K_d$ -Wert von 1  $\mu\text{M}$  gemessen. Zink zeigte eine noch stärker hemmende Wirkung. 1 mM Zn erhöht den  $K_d$ -Wert auf 10  $\mu\text{M}$ . Eine Einstellung der Konzentration zweiwertiger oder anderer Ionen (z.B.:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ) auf einen für die Bindung optimalen Bereich kann durch Substanzen, wie HEDTA, NTA bzw. allgemein Chelatoren/Puffer (ADA: N-[2-Acetamido]-2-iminodiacetic acid; 5-AMP: Adenosin-5'-Monophosphat; ADP: Adenosin-5'-Diphosphat; ATP: Adenosin-5'-Triphosphat; Bapta: 1,2-bis(2-Aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid; Citrat: Zitronensäure; EDTA: Ethylendiamintetraacetic acid; EGTA: Ethleneglycol-bis( $\beta$ -aminoethyl Ether) N,N,N',N'-Tetraacetic acid; HEDTA: N-hydroxyethylethylenediaminetriacetic acid; NTA: Nitrilotiracetic acid;  $\text{SO}_4$ . Sulfat) erfolgen, die als Puffer für zweiwertige Ionen benutzt werden können.

Die erfindungsgemäßen Verfahren können daher ferner Waschschrte umfassen. Je nachdem, ob ein direkter oder indirekter Nachweis eine Abtrennung von Probe und Bakteriophagenschwanzprotein nötig macht, können Waschschrte eingebaut werden. Da  $\text{Ca}^{2+}$  oder andere Metallionen (z.B.  $\text{Mg}^{2+}$ ) essentiell für die Bindung sind, kann die Bindung von Endotoxin an z.B. p12 (z.B. die kurzen Schwanzfaserproteine der Phagen K3, T2, T4, Ox2, RB32-33, AR1, PP01 und RB69) durch geeignete Waschschrte gelöst werden. Je nach Ziel, ob Endotoxin auf dem Bakteriophagenschwanzprotein, z.B. p12 (z.B. die kurzen Schwanzfaserproteine der Phagen K3, T2, T4, Ox2, RB32-33, AR1, PP01 und RB69) gebunden bleiben soll, wird mit EDTA-freiem Puffer gewaschen, wenn die Bindung gelöst werden soll mit EDTA-haltigem Puffer, wobei die EDTA-Konzentrationen im Bereich von mindestens 0,05 mM bis mehr als 10 mM, vorzugsweise im Bereich von 2 mM bis 5 mM liegt.



Da ionische Wechselwirkungen grundsätzlich immer durch Veränderungen der Ionenstärke beeinflussbar sind, können auch Erhöhungen oder Erniedrigungen anderer Salze in Lösung, wie z.B. NaCl oder KCl, die Bindung von Endotoxin an die Bakteriophagenschwanzproteine beeinflussen.

Um die Bindung im Nachweisverfahren direkt oder indirekt sichtbar zu machen, kann auch das Protein molekularbiologisch oder biochemisch verändert werden, um die Messung zu ermöglichen, bzw. zu verbessern. Um eine Bindung von Endotoxin z.B. an p12 von T4 oder die kurzen Schwanzfaserproteine der Phagen K3, T2, T4, Ox2, RB32-33, AR1, PP01 oder RB69 oder die Endotoxin-bindenden Proteine von Bakteriophagen ohne Schwanz direkt sichtbar zu machen, kann ein molekularbiologischer Austausch von Tyrosinresten gegen Tryptophan durchgeführt werden. Für eine Reduktion des Signalhintergrundes kann es dabei nötig sein, die ursprünglich enthaltenen Tryptophane gegen Tyrosine auszutauschen. Um auch in proteinhaltigen Lösungen messen zu können, kann p12 von T4 oder die kurzen Schwanzfaserproteine der Phagen K3, T2, T4, Ox2, RB32-33, AR1, PP01 oder RB69 nach Tryptophan-Einführung zusätzlich chemisch modifiziert werden. Dabei werden Tryptophanreste durch Koshland-Reagenz (2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromid) hinsichtlich ihrer spektroskopischen Eigenschaften verändert. Bei Verdrängungsexperimenten kann markiertes, z.B. fluoreszenzmarkiertes Endotoxin (z.B. Sigma) durch in der Probe befindliches Endotoxin z.B. von p12 von T4 oder die kurzen Schwanzfaserproteine der Phagen K3, T2, T4, Ox2, RB32-33, AR1, PP01 oder RB69 oder von z.B. PhiX 174 verdrängt und die Konzentration von freiem fluoreszierendem Endotoxin bestimmt werden.

Mit den erfindungsgemäßen Verfahren kann Endotoxin aus und in allen wässrigen Lösungen nachgewiesen werden. Diese Lösungen können Proteine, Plasmid-DNA, genomische DNA, RNA, Peptidoglykane, Polysaccharide, Protein-Nukleinsäurekomplexe wie z.B. Phagen oder Viren, Saccharide, Impfstoffe, Arzneimittel, Reaktionspuffer, Pufferlösungen allgemein, Medien, Dialysepuffer (Medizin), Salze, Blut, Blutbestandteile oder andere durch Endotoxin-Bindung verunreinigte Substanzen enthalten.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung sind Bakteriophagenproteine, an die sogenannte Tags, z.B. der Strep- oder der His-Tag, vorzugsweise an den N- oder C-Terminus des Proteins, besonders bevorzugt an den C-Terminus, gekoppelt sind. Bevorzugt ist die Kopplung oder Verknüpfung

der Tags mit den Bakteriophagenproteinen über DNA-Rekombinationstechnologie. Herstellung der Nukleinsäure, umfassend die Sequenz des Bakteriophagenproteins und des Tags und die Herstellung des Expressionsprodukts sind Stand der Technik und brauchen hier nicht gesondert erläutert zu werden. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Nukleinsäuresequenz, die ein  
5 Bakteriophagenprotein zusammen mit dem Strep- oder His-Tag codiert. Ein besonders bevorzugtes mit dem Strep- oder His-Tag modifiziertes Bakteriophagenprotein ist das p12-Protein vom Phagen T4, jedoch sind alle anderen Bakteriophagenproteine die an der Erkennung und Bindung von Bakterien beteiligt oder dafür verantwortlich sind ebenfalls bevorzugt.

- 10 Für die erfindungsgemäßen Verfahren werden vorzugsweise Bakteriophagenproteine mit einem Tag verwendet, der ein oberflächenexponiertes Cystein zur spezifischen, gerichteten Biotinylierung aufweist, z.B. die Tags gemäß SEQ ID NO:5, 6 und 7. Ein Beispiel für ein p12 mit Tag ist die in SEQ ID NO:8 aufgeführte Aminosäuresequenz. Bevorzugt ist ein p12 mit einem Tag, insbesondere mit einem Tag mit einem oberflächenexponierten Cystein,  
15 insbesondere ein p12 mit dem Tag gemäß SEQ ID NO: 6 und 7. Diese gerichtete Biotinylierung kann zusätzlich durch einen geeigneten Spacer oder Linker vermittelt werden.

Die erfindungsgemäßen Verfahren bieten gegenüber den bisherigen Nachweisverfahren für Endotoxin Vorteile in der Performance entsprechender Anwendungen. Ferner ist die Herstellung  
20 von Antikörper gegen LPS-Herzoligosaccharide sehr schwierig, was entsprechende Verfahren auf Antikörper-Basis sehr teuer werden lässt.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Endotoxin-Nachweis-Kit, umfassend die für das erfindungsgemäße Verfahren notwendigen Bestandteile. Das Kit umfasst insbesondere einen mit  
25 den hier beschriebenen Bakteriophagenschwanzproteinen beschichteten Träger, einen Behälter enthaltend ein Referenzendotoxin zur Erstellung und Messung einer Standardkurve, einen weiteren Behälter mit mindestens einem weiteren hier beschriebenen Bakteriophagenschwanzprotein, das gegebenenfalls für den Nachweis wie hier beschreiben modifiziert oder mit einem Aktiven Protein gekoppelt sein kann oder einem Behälter mit Anti-  
30 Lipid A Antikörper zum Nachweis von Endotoxin.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht als einschränkend aufzufassen. Sofern nicht anders angegeben, wurden molekularbiologische Standardmethoden verwendet, wie z.B. von Sambrook et al., 1989, Molecular cloning: A Laboratory Manual 2. Auflage, Cold

Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, beschrieben.

Die im folgenden beschriebenen Experimente wurden mit p12-Proteinen von T4, T2 und K3 durchgeführt. Falls nicht explizit anderweitig angegeben, wurden die Ergebnisse nur für p12 von T4 aufgeführt, da die Ergebnisse der drei Proteine aufgrund der hohen Homologie (Burda M.R.,  
5 Hindenach I., Miller S., Biol. Chem. (2000) 381, 225-258) austauschbar sind (Riede I., Mol Gen Genet. 1987 Jan;206(1):110-115). Dies trifft ebenfalls auf die anderen in Figur 7 aufgeführten Proteine zu.

Beispiel 1: Glasgefäße, Plastikgefäße und Puffer:

10 Für die Endotoxinentfernung wurden alle Glasgefäße durch Ausbacken bei 200°C (4h) entpyrogenisiert und ausschließlich pyrogenfreie Plastikmaterialien (z.B. Pipettenspitzen, Microtiterplatten) verwendet. Andere, nicht hitzebeständige Geräte oder Gefäße, wurden entweder mit 3% Wasserstoffperoxid behandelt oder mit 1% Natriumdeoxycholat gewaschen. Anschließend wurde sie mit endotoxinfreiem Wasser gespült. Die Puffer wurden aus weitgehend  
15 endotoxinfreien Puffersubstanzen (Sigma) hergestellt und mit endotoxinfreiem Wasser angesetzt. Salze, wie z.B. NaCl, die auf 200°C erhitzt werden können, wurden ausgebacken (200°C, 4h). Für chromatographische Reinigungen verwendete Puffer wurden entgast und filtriert.

Beispiel 2: Endotoxinnachweis mittels LAL-Test:

20 Endotoxin-Kontrollnachweise wurden mit einem chromogenen LAL-Test (Limulus-Amebocyte-Lysate Test, Charles-River Endosafe, Charleston, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Konzentrationsbestimmung wurden Endotoxin-Standards (Charles-River Endosafe, Charleston, USA) im Bereich von 0.005-50, bzw. 0.02-50 EU/ml eingesetzt. Die Absorptionsmessung bei 405 nm erfolgte in einem temperierbaren Mikrotiterplatten-Reader  
25 (Genios, Tecan GmbH).

Beispiel 3: Western-Blot zum p12-Nachweis:

Der Nachweis von p12 im Überstand von mit Beads behandelten Proben bzw. in den Fraktionen der Affinitätschromatographie erfolgte durch Western Blots. Zum Teil wurden die Proteine  
30 vorher durch NaDOC/TCA-Fällung (Natriumdeoxycholat/Tetrachloracetat) aufkonzentriert. Die Proben wurden dazu auf 12%-igen SDS Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF Membranen (Immobilon, Millipore) übertragen. Die Membranen wurden mit PBS 30 min gewaschen, mit 5% Milchpulver blockiert (1 h) und anschließend mit polyklonalem anti-p12 Antikörper inkubiert (1h, Verdünnung: 1: 1000). Nach Inkubation mit einem, mit alkalischer

Phosphatase konjugierter Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen IgG) erfolgte die Entwicklung der Proben mit BCIP/NBT (5-Brom-4-chloroindolylphosphat/Nitroblau-Tetrazoliumsalz).

5 Beispiel 4: Endotoxin-Reinigung:

Die Reinigung von Endotoxin wurde nach der Vorschrift von Galanos, C., Lüderitz, O. & Westphal, O. 1969, Europ. J. Biochem. 9, 245-249 durchgeführt.

Beispiel 5: Spezifische Kopplung von p12 an immobilisierte Jodoacetylreste:

- 10 Um eine gerichtete Bindung von p12 an die Oberfläche zu erreichen wurde die Aminosäure Serin an Position 3 des Strep-Tags gemäß SEQ ID NO:5 durch Cystein wie in Beispiel 12 ersetzt und das Protein über Jodoacetylreste, die bevorzugt freie Sulfhydrylreste binden, immobilisiert. Das resultierende p12 wurde p12S3C genannt.
- 15 Es wurde ein 1 ml Sulfolink Coupling Gel (Pierce) gegossen, mit 6 ml 1% Natriumdeoxycholat gewaschen und mit 6 ml Kopplungspuffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.5) equilibriert. Anschließend wurden 1 ml p12S3C (=N-StrepS3Cp12) (1-1.5 mg/ml in Kopplungspuffer) injiziert, die Säule 15 min leicht geschüttelt, weitere 30 min ohne Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert, und nochmals 1 ml p12S3C injiziert und die Inkubationsschritte
- 20 wiederholt. Diese Kopplung von p12S3C wurde insgesamt 4 mal wiederholt, und anschließend die Säule mit 6 ml Kopplungspuffer gewaschen. Die Durchläufe wurden gesammelt und die jeweilige p12S3C Konzentration durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt. Es wurden 2.2-2.8 mg p12S3C pro ml Gel gebunden. Anschließend wurden überzählige Jodoacetylreste durch Inkubation (45 min) mit 1 ml Cystein (50 mM in 50 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8.5)
- 25 blockiert. Nach Waschen der Säule mit 16 ml 1M NaCl und 16 ml 20 mM Hepes, 150 mM NaCl pH 7.5 war die Säule fertig zum Gebrauch.

- Die Fähigkeit dieses Gels Endotoxin aus Proteinlösungen zu entfernen, wurde mit BSA (2-4 mg/ml), Carbon Anhydrase (1-2 mg/ml) und Lysozym (3-4 mg/ml) getestet. BSA und Lysozym
- 30 Lösungen wurden mit Endotoxin von E. coli O55:B5 (Charles-River Endosafe, Charleston, USA) oder E. coli HMS 174 gespickt (100-1000 EU/ml), während die Carbon Anhydrase nicht mit zusätzlichem Endotoxin versetzt wurde. Es wurde jeweils 0.5 ml Proteinlösung auf die Säule gegeben, 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Säule mit Puffer gewaschen. Die Proteine wurden fraktionsweise gesammelt und der Endotoxingehalt vor und

nach der Säule mittels eines chromogenen LAL-Tests (Charles-River Endosafe, Charleston, USA) bestimmt. Außerdem wurde die Proteinwiederfindung durch Absorptionsmessungen bei 280 nm ermittelt. Die Endotoxine konnten aus allen 3 Proteinlösungen fast vollständig (93-99%) entfernt werden, wie in Fig. 2A gezeigt. Außerdem konnten die Proteine weitgehend von der Säule eluiert werden (80-99%, Fig. 2B). Die Säule wurde abschließend mit 5 mM EDTA, 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5 regeneriert. Um Verunreinigungen der Proteinfractionen nach dem Lauf über die Säule durch sich ablösendes p12 auszuschließen, wurden die Fraktionen mittels der Western Blot Technik auf p12 untersucht. Es konnte kein p12 in den Fraktionen nachgewiesen werden.

Beispiel 6: Unspezifische Kopplung von p12 an NHS-aktiviertes Trägermaterial:

N-hydroxysuccinimid (NHS) wird aus Verbindungen durch primäre Aminoreste verdrängt und deshalb zum Koppeln von Proteinen an Oberflächen benutzt. NHS-aktivierte Sepharose Säulen (HiTrap NHS-activated HP, 1 ml, Amersham-Pharmacia-Biotech) wurden zunächst mit 6 ml eiskalter 1 mM Salzsäure gewaschen. Anschließend wurden bei Raumtemperatur 10-15 ml p12S3C (1.0-3.5 mg/ml) in 0.2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 M NaCl, pH 8.3 zirkulär über die Säule gepumpt (Flussrate 0.8 ml/min). Nach 60 min wurde der Durchlauf fraktionsweise gesammelt und die Säule mit 6 ml Puffer gewaschen. Aus diesen Fraktionen wurde das NHS durch Entsalzen der Lösung über HiTrap-Desalting Säulchen (5 ml, Amersham-Pharmacia-Biotech) abgetrennt und anschließend die p12-Menge durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt. 20-25 mg p12S3C wurden an die Säule gebunden. Die Säule wurde nach der Kopplung entsprechend den Herstellerangaben wiederholt mit jeweils 6 ml Blockierungspuffer (0.5 M Ethanolamin, 0.5 M NaCl, pH 8.3) und Waschpuffer (0.1 M Acetat, 0.5 M NaCl, pH 4.0) gespült. Anschließend wurde die Säule mit 6 ml Gebrauchspuffer (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5 oder 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.5) equilibriert.

Die Endotoxinentfernung über diese Säule wurde mit Lysozymbösungen (3-4 mg/ml in 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5 oder 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.5) getestet. Die Lysozymbösungen wurden mit Endotoxin von E. coli HMS 174 gespickt (~500 EU/ml). Es wurden 0.5 ml Proteinlösung auf die Säule gegeben, 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Säule mit Puffer gewaschen. Das Lysozym wurden fraktionsweise gesammelt und der Endotoxingehalt vor und nach der Säule mittels eines chromogenen LAL-Tests (Charles-River Endosafe, Charleston, USA) bestimmt. Außerdem wurde die Proteinwiederfindung durch Absorptionsmessungen bei 280 nm ermittelt. Die Endotoxine wurden zu 85-90% aus der Lösung

entfernt, wie in Fig. 3A gezeigt und 85-90% des Lysozyms konnten durch Waschen mit Gebrauchspuffer wieder von der Säule eluiert werden (Fig. 3B). Die Säule wurde anschließend mit 6 ml 5 mM EDTA, 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5 und 6 ml 1 M NaCl gewaschen. Um Verunreinigungen der Proteinfractionen nach dem Lauf über die Säule durch sich ablösendes p12 auszuschließen, wurden die Fraktionen mittels der Western Blot Technik auf p12 untersucht. Es konnte kein p12 in den Fraktionen nachgewiesen werden.

Beispiel 7: Gerichtete Kopplung von p12 an über Diaminoethan und N-Succinimidyl-iodoacetat (SIA) als Spacer an NHS-aktiviertes Trägermaterial-Säule.

- 10 Um eine gerichtete Bindung an das Chromatographie Trägermaterial zu erreichen wurde ein bifunktionaler Linker an NHS-aktivierte Oberfläche gebunden, der eine Kopplung von p12S3C über dessen freies Cystein und Iodoacetylreste des bifunktionalen Linkers ermöglicht.

- 15 NHS-aktivierte Sepharose Säulen (HiTrap NHS-activated HP, 1 ml, Amersham-Pharmacia-Biotech) wurden zunächst mit 6 ml eiskalter 1 mM Salzsäure gewaschen, danach 1 ml Ethylendiamin (10 mg/ml in 0.2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 M NaCl, pH 8.3) injiziert und die Säule 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Blockieren überzähliger NHS-Gruppen mit Ethanolamin (0.5 M Ethanolamin, 0.5 M NaCl, pH 8.3) und Waschen (0.1 M Acetat, 0.5 M NaCl, pH 4.0) der Säule wurde die Säule mit 6 ml Boratpuffer (50 mM Natriumborat, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 20 pH 8.3) equilibriert. Anschließend wurde 30 min lang 10 ml N-Succinimidyl-iodoacetat (SIA, Pierce, 200 µl SIA-Stammlösung in 10 ml Boratpuffer; SIA-Stammlösung: 1.4 mg SIA in 1 ml DMSO) zirkulär über die Säule gespült. Die Säule wurde danach mit 6 ml Boratpuffer gewaschen und 1 Stunde lang p12S3C (1 mg/ml, 50 ml in Boratpuffer) über die Säule gespült. Überschüssige Iodoacetylreste wurden mit 1 ml Cysteinlösung (5mM Cystein in Boratpuffer, 15 25 min bei Raumtemperatur inkubieren) abgesättigt, bevor die Säule mit den Gebrauchspuffern (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5 oder 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.5) equilibriert wurden. Die Kopplungsreaktionen mit SIA wurden im Dunkeln durchgeführt.

- Die Endotoxinentfernung über diese Säule wurde mit Lysozymlösungen (3-4 mg/ml in 20 mM 30 Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5 oder 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.5) getestet. Die Lysozymlösungen wurden mit Endotoxin von E. coli HMS 174 gespickt (~500 EU/ml). Es wurde 0.5 ml Proteinlösung auf die Säule gegeben, 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Säule mit Puffer gewaschen. Das Lysozym wurde fraktionsweise gesammelt und der Endotoxingehalt vor und nach der Säule mittels eines chromogenen LAL-Tests (Charles-

River Endosafe, Charleston, USA) bestimmt. Außerdem wurde die Proteinwiederfindung durch Absorptionsmessungen bei 280 nm ermittelt. Die Endotoxine wurden zu 90% aus der Lösung entfernt und 75-85% des Lysozyms konnten durch Waschen mit Gebrauchspuffer wieder von der Säule eluiert werden. Die Säule wurde anschließend mit 6 ml 5 mM EDTA, 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5 und 6 ml 1 M NaCl gewaschen. Um Verunreinigungen der Proteinfractionen nach dem Lauf über die Säule durch sich ablösendes p12 auszuschließen, wurden die Fraktionen mittels der Western Blot Technik auf p12 untersucht. Es konnte kein p12 in den Fraktionen nachgewiesen werden.

10 Beispiel 8: Entfernung von Endotoxin aus einer BSA-Lösung im Durchflussverfahren

Hi-Trap-NHS aktivierte Sepharose (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) wurde nach Vorschrift des Herstellers unspezifisch über primäre Aminogruppen mit p12 gekoppelt. Dabei wurden 8 mg p12 pro ml Gelmaterial kovalent immobilisiert. Die so erhaltene 1 ml Chromatographiesäule wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min mit 10 ml Puffer A (20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>) äquilibriert. Im Anschluß wurden 4 ml einer BSA Lösung (11.5mg BSA (Carl Roth GmbH, Deutschland) / ml Puffer A) aufgetragen (Injektion: I) und der Durchlauf (E) in 2,5 ml Fraktionen gesammelt. Die Säule wurde anschließend mit 15 ml Puffer A gewaschen und das an die Säule gebundene Endotoxin wurde mit 7 ml Puffer B (20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA) eluiert. Bei Waschen und Elution wurden jeweils 2 ml Fraktionen gesammelt. Nach jedem Experiment wurde die Säule mit 20 ml Puffer C (20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1 % Natriumdesoxycholat) regeneriert. Die Endotoxin-Konzentration wurde durch einen chromogenen Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Test (Charles-River Endosafe, Charleston, USA), nach Vorschrift des Herstellers bestimmt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Messung der UV-Absorption. Die Endotoxin-Entfernungseffizienz betrug zwischen 95-99% und der Proteinverlust betrug etwa 6-10 %.

30 Beispiel 9: Entfernung geringer Endotoxinmengen aus Puffer mittels unspezifisch gekoppeltem p12. 20 ml NHS-aktivierte Sepharose 4 FastFlow (Amersham Biosciences) wurden zunächst mit eiskalter Salzsäure gewaschen und anschließend mit 292 mg p12 (7 mg/ml in 25 mM Citrat pH 7.0) 4 Stunden unter schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose mit 7 x 80 ml 5 mM Citrat pH 2.0 gewaschen und jeweils 1 ml der Waschfraktionen gegen 5 mM Citrat pH 2.0 dialysiert. Diese Dialysate wurden benutzt, um das überschüssige p12 in den Waschfraktionen mittels Absorptionsmessung bei 280 nm zu quantifizieren. Es wurde eine

Beladungsdichte von 8.7 mg p12 pro 1ml Sepharose bestimmt. Nicht abreagierte NHS-Reste wurden durch 12 h Inkubation der Sepharose mit 1M Tris pH 8.0 abgesättigt. Mit diesem Säulenmaterial wurden Säulen mit 2 ml Volumen gegossen und diese bei 4°C in 20% Ethanol bis zum Gebrauch gelagert.

- 5 In 3 Parallelversuchen wurde jeweils 4 ml Endotoxin Lösung (S) auf eine Säule aufgetragen. Die Endotoxin Lösung bestand aus Endotoxin von E. coli O55:B5 (Charles-River Endosafe, Charleston, USA) in Equilibrationspuffer (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5). Die Endotoxin Konzentration dieser Lösung lag bei 4.6 EU/ml.
- Die Säulen wurde zunächst mit 12 ml Regenerationspuffer (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mM  
10 EDTA, pH 7.5) und anschließend mit 12 ml Equilibrationspuffer gespült. Anschließend wurde nochmals Equilibrationspuffer auf die Säule gegeben und 1ml fraktioniert.
- Die Endotoxin Lösung wurden auf die Säulen aufgetragen (I) und Fraktionen von 5 ml und 2 ml gesammelt. Anschließend wurde die Säule mit 4 ml Regenerationspuffer (B) regeneriert. In den Durchlaufaktionen konnte kein Endotoxin detektiert werden, d.h. die Endotoxin  
15 Verunreinigungen konnten in allen drei Experimenten vollständig entfernt werden. Dieses Beispiel zeigt deutlich, dass auch bei geringen Endotoxinmengen eine Bindung erfolgt, was einem Nachweis geringer Endotoxinmengen entspricht.

- 20 Beispiel 10: unspezifische Kopplung von biotinyliertem p12 an magnetische Streptavidin-Beads.
- p12 (3 mg/ml in PBS, 0.05% Tween20) wurde mit Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Pierce), im Verhältnis 1:10 bis 1:20 eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend gegen Puffer (z.B. PBS oder 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.5) dialysiert. NHS-aktiviertes Biotin bindet dabei an primäre Aminoreste von p12. Anschließend wurden zu 1ml Streptavidin Beads  
25 (MagPrep Streptavidin Beads, Merck) 50 µl biotinyliertes p12 (1 mg/ml) gegeben, 2h bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend überschüssiges p12 durch viermaliges Waschen mit 1.5 ml 20 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7.5 entfernt.

- Die Endotoxinentfernung wurde mit Puffer (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5) und  
30 Proteinlösungen (0.1 mg/ml BSA, 0.1 mg/ml Lysozym, 0.1 mg/ml Carbon Anhydrase in 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5) getestet. Der Puffer sowie die BSA- und Lysozym-Lösung wurde mit 5 EU/ml (Endotoxin aus E. coli O55:B5, Charles-River Endosafe, Charleston, USA) gespickt. Die Carbon Anhydrase Lösung enthielt etwa 1 EU/ml. Zu 200 µl Puffer bzw. Proteinlösung wurden 25 µl magnetische Beads mit immobilisiertem p12 gegeben, durch auf-



und abpipettieren vermischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Beads wurden mit Hilfe eines Magneten aus der Lösung entfernt, der Überstand abpipettiert. Der Endotoxingehalt von unbehandelten Proben und mit Beads inkubierten Proben wurde anschließend mit dem LAL-Test bestimmt und die Proteinwiederfindung durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt.

5 Aus Puffer ließ sich das Endotoxin praktisch vollständig entfernen (99.9 % Endotoxinentfernung) und auch aus der Proteinlösung wurde das Endotoxin um 70-92% abgereichert. Die Proteinwiederfindung lag zwischen 57% und 99% (BSA: 87 %, Carbon Anhydrase: 99%, Lysozym: 57 %; Fig. 4B).

10 Beispiel 11: unspezifische Kopplung von biotinyliertem p12 an immobilisiertes Streptavidin.

P12 (3 mg/ml in PBS, 0.05% Tween20) wurde mit Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Pierce), im Verhältnis 1:10 bis 1:20 eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend gegen Puffer (z.B. PBS oder 20 mM Hepes, 150 mM NaCl 5 mM EDTA, pH 7.5) dialysiert. NHS-aktiviertes Biotin bindet dabei an primäre Aminoreste von p12. Das biotinylierte p12 wird anschließend 1 h bei  
15 Raumtemperatur mit Streptavidin beladenen Chromatographiematerial (ImmunoPure immobilized Streptavidin: 6% quervernetzte Agarose Beads) inkubiert und überschüssiges p12 durch Waschen mit PBS entfernt.

Die Endotoxinentfernung wurde mit Puffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0) und BSA (0.5  
20 mg/ml in 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0) getestet. Je 1 ml Puffer bzw. BSA-Lösung wurden mit 10 EU/ml gespickt, 50 µl p12-Agarose zugegeben, 1 Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Die p12 Agarose wurde anschließend abzentrifugiert und die Endotoxin- und Proteinkonzentration im Überstand gemessen. Aus dem Puffer konnten 99% und aus der BSA-Lösung 86 % Endotoxin entfernt werden. BSA konnte zu 90 % wiedergefunden werden.

25

Beispiel 12: Untersuchungen über die p12-Endotoxin Bindung mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Messungen

Die Bindung von p12 an Endotoxin oder an Bakterien, über die Lipopolysaccharide in der äußeren Zellmembran, wurde mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz Messungen untersucht  
30 (Biacore J). Um die Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) zu ermittelt, wurde Endotoxin von E. coli O55:B5 (Sigma) auf einem hydrophoben HPA-Chip entsprechend der Anleitung des Herstellers immobilisiert und p12 in verschiedenen Konzentrationen injiziert (Fig. 2A). Die Bindung wird in relativen „Response Units“ (RU) gemessen die Gleichgewichtswerte gegen die dazugehörigen p12-Konzentrationen aufgetragen (Fig. 2B). Durch Anpassen der Langmuirschen

Adsorptionsisotherme ( $RU = (RU_{\max} * [p12]) / ([p12] + K_d)$ ) an diese Daten wurde der  $K_d$ -Wert ermittelt (Tabelle 1). Für die Messungen wurden endotoxinfreie Puffer verwendet. Für pH-Werte zwischen 6 und 10 wurden  $K_d$ -Werte im Bereich von  $10^{-7}$  bis  $10^{-9}$  M ermittelt (Tabelle 1). Die Bindung wurde durch Injektion von 1mM oder 5 mM EDTA wiederaufgehoben und der

5 Chip regeneriert.

10

pH	Kd
6,00	3,09E-07
7,50	6,85E-08
8,00	5,86E-08
8,50	7,86E-08
9,00	3,29E-08
10,00	1,55E-07

15

Tabelle 1: Dissoziationskonstanten von Endotoxin an p12 in Abhängigkeit von dem pH-Wert der Lösung.

20 Um die Bindung von Bakterien an p12 zu untersuchen, wurde biotinyliertes p12 auf Streptavidin-Chips immobilisiert und verschiedene E. coli Stämme injiziert. Die Bakterien wurden für die Messungen in PBS aufgenommen. Es wurden E. coli Stämme verwendet, die Lipopolysaccharide mit unterschiedlichen Polysaccharid-Anteilen besitzen. Der

25 Polysaccharidteil besteht aus einer „Herz“-Region, die mit dem Lipid A verknüpft ist und dem sogenannten O-Antigen. Das O-Antigen variiert sehr stark zwischen verschiedenen Bakterienarten und auch Bakterienstämmen, während die „Herz“-Region stark konserviert ist. Stämme, die die „Herz“-Region und O-Antigen (z.B. E. coli), sowie Stämme die eine vollständige „Herz“-Region (E. coli D21) besitzen wurden von p12 gebunden, während Stämme

30 mit einem stark verkürzter „Herz“-Region (z.B. E. coli D21f2) nicht mehr von p12 erkannt wurden (Fig. 2C). Die Bindung konnte durch EDTA (5 mM) wieder gelöst und der Chip regeneriert werden.

Beispiel 13: rekombinante p12-Konstrukte

1. Konstruktion von p12 mit N-terminalem Strep-Tag (N-Strep-p12): Mittels PCR wurde an das 5'-Ende des T4p12-Gens die Nukleotidsequenz für den Strep-Tag (US patent 5,506,121) eingeführt. Hierfür wurde für das 5'-Ende des p12-Gens ein Primer konstruiert (5'-GAA GGA  
 5 ACT AGT CAT ATG GCT AGC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA GGC GCC AGT  
 AAT AAT ACA TAT CAA CAC GTT-3' (SEQ ID NO:1), der die Nukleotidsequenz des Strep-  
 Tags an seinem 5'-Ende beinhaltet (kursiv in der Sequenz) und eine Restriktionsschnittstelle  
 (*NdeI*, unterstrichen in der Sequenz) derart besitzt, dass das Gen im richtigen Leseraster in das  
 Expressionsplasmid eingesetzt werden kann. Für das 3'-Ende des p12-Gens wurde ein Primer  
 10 konstruiert, der hinter dem p12-Gen eine *BamH I* Restriktionsschnittstelle (kursiv in der  
 Sequenz) einführt (5'-ACG CGC AAA GCT TGT CGA CGG ATC CTA TCA TTC TTT TAC  
 CTT AAT TAT GTA GTT-3'), (SEQ ID NO:2). Die PCR wurde mit 40 Cyclen (1 min 95°C, 1  
 min 45°C und 1 min 72°C) durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde mit den  
 Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BamHI* geschnitten und das gewünschte Fragment nach  
 15 Größenfraktionierung über ein Agarosegel und Elution aus dem Gel in die *NdeI* und *BamHI* site  
 des Expressionsplasmids pET21a eingesetzt. Die Sequenz des N-Strep-p12-Gens wurde über  
 DNA-Sequenzierung auf seine Richtigkeit hin überprüft. Die weiteren Schritte zum Plasmid  
 pNS-T4p12p57 wurden wie von Burda, M.R. & Miller, S. (Eur J Biochem. 1999 265 (2), 771-  
 778) für T4p12p57 beschrieben durchgeführt. Das Plasmid pNS-T4p12p57 wurde dann in den  
 20 Expressionsstamm BL21 (DE3) transformiert.

2. Einfügen eines N-terminalen Cysteinrests in N-Strep-p12 (N-Strep-S3C-p12 und N-  
 Strep-S14C-p12): Die Einfügung eines N-terminalen Cysteinrestes wurde wie unter 1.  
 beschrieben durchgeführt, wobei dafür zwei neue Primer für das 5'-Ende konstruiert wurden. Für  
 25 das N-Strep-S3C-p12 wurde der Primer 5'-GAA GGA ACT AGT CAT ATG GCT TGT TGG  
AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA GGC GCC AGT AAT AAT ACA TAT CAA CAC GTT-  
 3' (SEQ ID NO:3), für das N-Strep-S14C-p12 wurde der Primer 5'-GAA GGA ACT AGT CAT  
ATG GCT AGC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA GGC GCC TGT AAT AAT ACA  
 TAT CAA CAC GTT-3' (SEQ ID NO:4) verwendet.

30

3. Reinigung von N-Strep-p12 Protein: Der *E. coli* Stamm BL21(DE3) mit dem Plasmid  
 pNS-T4p12p57 wurde in 2 l Schüttelkulturen (LB-Medium mit Ampicillin 100 µg/ml) bis zu  
 einer OD600 von 0.5-0.7 bei 37°C gezogen und die Expression des N-Strep-p12-Proteins wurde  
 durch Zugabe von 1mM IPTG (Isopropyl-β-thio-galactopyranoside) induziert. Nach Inkubation

bei 37°C für 4h wurden die Zellen abgeerntet. Geerntete Zellen aus 10 l Kultur wurden in 50 ml Natriumphosphat, 20 mM pH 7.2, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 M NaCl aufgenommen, durch dreimalige French-Press-Behandlung (20.000 psi) aufgebrochen und anschließend 30 min bei 15.000 rpm (SS34) abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen im gleichen Puffer wurde das N-Strep-p12 Protein aus dem Pellet das Pellet 3x mit durch Rühren für 30 min in 40 mM TrisHCl pH 8.0, 10 mM EDTA extrahiert, der Ansatz für 30 min bei 15.000 rpm (SS34) zentrifugiert und das abgelöste NS-p12 im Überstand bei 4°C gelagert. Die Extraktion wurde zweimal wiederholt, und die vereinigten Überstände wurden auf eine Streptactin-Affinitätssäule (15 ml), äquilibriert mit Puffer „W“ (100 mM TrisHCl pH 8, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl), aufgetragen (IBA GmbH, Göttingen). Nach Waschen mit 5 Säulenvolumina Puffer „W“ wurde mit 3 Volumina Puffer „W“ mit 2.5 mM Desthiobiotin in Puffer „W“ eluiert. Nach mehrmaliger Dialyse gegen Puffer „W“ und Aufkonzentration wurde über SDS-PAGE und UV-Spektroskopie (Burda et.al. 1999) die Konzentration und Reinheit von N-Strep-T4p12 ermittelt. Aus 10 Liter Kultur wurden so ca. 100 mg N-Strep-T4p12 gereinigt.

Name	Sequenz des Tag	
Nstrep-p12	MASWSHPQFEKGAS	SEQ ID NO: 5
Nstrep-p12-S3C	MACWSHPQFEKGAS	SEQ ID NO: 6
Nstrep-p12-S14C	MASWSHPQFEKGAC	SEQ ID NO: 7

#### Beispiel 14: Nachweis von LPS über die Bindung von p12 an immobilisiertes LPS.

Es wurden mit Polymyxin B Sepharose (Detoxi-Gel, Pierce) 4 Säulen mit je 0.5 ml Volumen gegossen. Die Säulen wurden mit je 3 ml Natriumphosphat Puffer (20 mM Natriumphosphat, pH 12.0) und je 3 ml Regenerationspuffer (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7.5) gewaschen. Anschließend wurden auf zwei dieser Säulen je 1 ml LPS von E. coli O55:B5 aufgetragen (0.1 mg/ml in Hepes Puffer, 10<sup>6</sup> EU/ml). Die zwei anderen Säulen wurden mit je 1 ml Regenerationspuffer gespült. Danach wurden alle Säulen mit je 3 ml Equilibrationspuffer (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5) gewaschen und anschließend nochmals 1 ml dieses Puffers aufgetragen und als Fraktion 1 aufgefangen. Anschließend wurden 0.5 ml einer Lösung mit dem Bakteriophagenschwanzprotein p12 (0.844 mg/ml in 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>) auf die Säulen aufgetragen und mit 2.5 ml Equilibrationspuffer und 2 ml Regenerationspuffer gewaschen. Der Durchlauf wurde in Fraktionen von dreimal 1 ml und einmal 2 ml aufgefangen und die Konzentration des Bakteriophagenschwanzproteins p12 in diesen Fraktionen mittels Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt (Figur 4). Das Bakteriophagenschwanzprotein p12 wurde zum großen Teil an die Säulen gebunden, die vorher

mit LPS behandelt worden waren, und konnte durch Zugabe von Regenerationspuffer von diesen Säulen gelöst werden. Im Gegensatz dazu lief es ohne Verzögerung durch die Säulen, die nicht mit LPS behandelt worden waren.

5 Beispiel 15: Nachweis der Bindung von Endotoxin-Polysaccharid an die T4p12 Mutante W359 Y W283Y.

In der verwendeten T4p12 Mutante ist an den Positionen 359 und 283 die Aminosäure Tryptophan gegen Tyrosin ersetzt. Für die Fluoreszenzuntersuchungen wurde ein Polysaccharid (MW = 2 kDa), das aus dem Endotoxin von *Salmonella typhimurium* stammt, verwendet.  
10 Sowohl die p12 Mutante (40 oder 200 µg/ml) als auch das Endotoxin-Polysaccharid waren in 5 mM Citrat pH 2 gelöst worden. Die Fluoreszenz im Bereich von 305-450 nm wurde durch Anregung bei 295 nm. Es wurden 120 µl eine Lösung mit der p12 Mutante W359 Y W283Y in einer Fluoreszenzküvette vorgelegt die Fluoreszenz gemessen und anschließend schrittweise Polysaccharid zugegeben (Endkonzentration: 0.5 – 120000 nM) und nach Mischen der Probe  
15 erneut die Fluoreszenz gemessen. In Kontrollversuchen wurde derselbe Versuch ohne die p12 Mutante durchgeführt und die Messkurven gegen diese Daten korrigiert.

Die Bindung von Endotoxin oder einem Endotoxin-Polysaccharid reduziert die Fluoreszenz dieser Mutante (Figur 5). Dies kann für den Nachweis von Endotoxin eingesetzt werden.

20 Beispiel 16: Immobilisierung von Lipopolysaccharid über T4p12 und Nachweis der Bindung über einen anti-Lipid A Antikörper. Zum Nachweis sollen Lipopolysaccharide zunächst aus einer Probenlösung an eine Oberfläche gebunden werden und anschließend diese immobilisierten Lipopolysaccharide mit Hilfe eines zweiten Proteins, das an Lipopolysaccharide bindet, nachgewiesen werden. Um die Machbarkeit dieser Nachweismethode darzustellen, wurde  
25 solcher ein „Sandwich“ auf der Oberfläche eines Biacore Chips konstruiert und die Bindung von Lipopolysaccharid und eines Lipid A Antikörpers mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanzmessung verfolgt.

Dazu wurde zunächst T4p12 an die Oberfläche eines CM-5 Chips (Biacore) kovalent gekoppelt. Die Carboxylreste der Oberfläche wurden mit einer Mischung aus EDC (N-(3-dimethylamionpropyl)carbodiimide hydrochloride, 75 mg/ml) und NHS (N-hydroxysuccinimide,  
30 11.5 mg/ml) aktiviert und anschließend T4p12 injiziert, dessen primäre Aminoreste mit der aktivierten Oberfläche reagierten. Die Oberfläche einer zweiten Referenzzelle blieb unbehandelt. Die Bindung von 100 µl Lipopolysaccharid (E. coli O55:B5, 0.1 mg/ml) an T4p12 konnte anhand der Zunahme des Resonanzsignals verfolgt werden (siehe Fig 6). Auch nach dem Ende

der Injektion blieb das Resonanzsignal auf seinem Niveau und zeigt damit eine stabile Bindung an. Nachfolgende Injektionen eines anti-Lipid A Antikörpers (2 µg/ml, polyklonaler Antikörper gegen Lipid A aus Ziege von Accurate Chemical & Scientific Corporation, Produkt Nummer YVS6921) zeigten ebenfalls eine Zunahme des Resonanzsignals und damit eine Bindung des Antikörpers. Das Resonanzsignal konnte durch Injektion von EDTA (2 mM), das die Bindung von Lipopolysaccharid and T4p12 aufhebt, wieder auf das Ausgangsniveau gesenkt werden. Dies bedeutet, dass die Signalzunahme, die durch die Injektion des Antikörpers induziert wurde, durch die Bindung an Lipopolysaccharid erfolgte.

Die Experimente wurden in folgendem Puffer durchgeführt: 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5.

Beispiel 17: Immobilisierung von Lipopolysaccharid über T2p12 und Nachweis der Bindung über einen anti-Lipid A Antikörpers. T2p12 wurde analog zu T4p12 kloniert, exprimiert und gereinigt. Zum Nachweis werden Lipopolysaccharide zunächst aus einer Probenlösung an eine Oberfläche gebunden und anschließend diese immobilisierten Lipopolysaccharide mit Hilfe eines zweiten Proteins, das an Lipopolysaccharide bindet, nachgewiesen. Um die Machbarkeit dieser Nachweismethode darzustellen, wurde solcher ein „Sandwich“ auf der Oberfläche eines Biacore Chips konstruiert und die Bindung von Lipopolysaccharid und eines Lipid A Antikörpers mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanzmessung verfolgt.

Dazu wurde zunächst T2p12 an die Oberfläche eines CM-5 Chips (Biacore) kovalent gekoppelt. Die Carboxylreste der Oberfläche wurden mit einer Mischung aus EDC (N-(3-dimethylamionpropyl)carbodiimide hydrochloride, 75 mg/ml) und NHS (N-hydroxysuccinimide, 11.5 mg/ml) aktiviert und anschließend T2p12 injiziert, dessen primäre Aminoreste mit der aktivierten Oberfläche reagierten. Die Oberfläche einer zweiten Referenzzelle blieb unbehandelt.

Die Bindung von 100 µl Lipopolysaccharid (E. coli O55:B5, 0.1 mg/ml) an T2p12 konnte anhand der Zunahme des Resonanzsignals verfolgt werden. Auch nach dem Ende der Injektion blieb das Resonanzsignal auf seinem Niveau und zeigt damit eine stabile Bindung an. Nachfolgende Injektionen eines anti-Lipid A Antikörpers (2.1 µg/ml, polyklonaler Antikörper gegen Lipid A aus Ziege von Accurate Chemical & Scientific Corporation, Produkt Nummer YVS6921) zeigten ebenfalls eine Zunahme des Resonanzsignals und damit eine Bindung des Antikörpers. Das Resonanzsignal konnte durch Injektion von EDTA (2 mM), das die Bindung von Lipopolysaccharid and T2p12 aufhebt, wieder auf das Ausgangsniveau gesenkt werden. Dies bedeutet, dass die Signalzunahme, die durch die Injektion des Antikörpers induziert wurde, durch die Bindung an Lipopolysaccharid erfolgte.

Die Experimente wurden in folgendem Puffer durchgeführt: 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5.

Beispiel 18: Immobilisierung von Lipopolysaccharid über RB69p12 und Nachweis der Bindung

5 über einen anti-Lipid A Antikörpers. RB69p12 wurde analog zu T4p12 kloniert, exprimiert und gereinigt. Zum Nachweis werden Lipopolysaccharide zunächst aus einer Probenlösung an eine Oberfläche gebunden und anschließend diese immobilisierten Lipopolysaccharide mit Hilfe eines zweiten Proteins, das an Lipopolysaccharide bindet, nachgewiesen. Um die Machbarkeit dieser Nachweismethode darzustellen, wurde solcher ein „Sandwich“ auf der Oberfläche eines  
10 Biacore Chips konstruiert und die Bindung von Lipopolysaccharid und eines Lipid A Antikörpers mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanzmessung verfolgt.

Dazu wurde zunächst RB69p12 an die Oberfläche eines CM-5 Chips (Biacore) kovalent gekoppelt. Die Carboxylreste der Oberfläche wurden mit einer Mischung aus EDC (N-(3-dimethylamionpropyl)carbodiimide hydrochloride, 75 mg/ml) und NHS (N-hydroxysuccinimide,  
15 11.5 mg/ml) aktiviert und anschließend RB69p12 injiziert, dessen primäre Aminoreste mit der aktivierten Oberfläche reagierten. Die Oberfläche einer zweiten Referenzzelle blieb unbehandelt. Die Bindung von 100 µl Lipopolysaccharid (E. coli O55:B5, 0.1 mg/ml) an RB69p12 konnte anhand der Zunahme des Resonanzsignals verfolgt werden. Auch nach dem Ende der Injektion blieb das Resonanzsignal auf seinem Niveau und zeigt damit eine stabile Bindung an.  
20 Nachfolgende Injektionen eines anti-Lipid A Antikörpers (2.1 µg/ml, polyklonaler Antikörper gegen Lipid A aus Ziege von Accurate Chemical & Scientific Corporation, Produkt Nummer YVS6921) zeigten ebenfalls eine Zunahme des Resonanzsignals und damit eine Bindung des Antikörpers. Das Resonanzsignal konnte durch Injektion von EDTA (2 mM), das die Bindung von Lipopolysaccharid and RB69p12 aufhebt, wieder auf das Ausgangsniveau gesenkt werden.  
25 Dies bedeutet, dass die Signalzunahme, die durch die Injektion des Antikörpers induziert wurde, durch die Bindung an Lipopolysaccharid erfolgte.

Die Experimente wurden in folgendem Puffer durchgeführt: 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5.

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Endotoxin, umfassend die Schritte:
  - a) Inkubieren einer Probe mit Bakteriophagenschwanzproteinen, und anschließend
  - 5 b) Nachweis von an Bakteriophagenschwanzproteine gebundenem Endotoxin mittels spektroskopischer Verfahren, ELISA, chemischer oder enzymatischer Nachweisreaktion von Endotoxinen oder abgespaltenen Endotoxinkomponenten, oder mittels Kapazitätsmessung.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, ferner umfassend nach Schritt a) und vor Schritt b) den zusätzlichen Schritt
  - a') Abtrennung der Bakteriophagenschwanzprotein-Endotoxin-Komplexe von der Probe.
- 15 3. Verfahren zum Nachweis von Endotoxin, umfassend die Schritte:
  - a) In Kontakt bringen einer Probe enthaltend Endotoxine mit einer Oberfläche, anschließend
  - b) Inkubieren von Bakteriophagenschwanzproteinen an die auf der Oberfläche immobilisierten Endotoxine, und
  - 20 c) Nachweis der Bakteriophagenschwanzproteine mittels spektroskopischer Verfahren, ELISA, chemischer oder enzymatischer Nachweisreaktion von Endotoxinen oder abgespaltenen Endotoxinkomponenten, oder mittels Kapazitätsmessung.
4. Verfahren nach Anspruch 3, ferner umfassend nach Schritt b) und vor Schritt c) den  
25 zusätzlichen Schritt
  - b') Abtrennen der gebundenen Bakteriophagenschwanzproteine vom Endotoxin.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Bakteriophagenschwanzprotein ein Protein der kurzen Bakteriophagenschwanzfaser oder  
30 ein Hüllprotein von Bakteriophagen ohne Schwanz ist.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Protein der kurzen Bakteriophagenschwanzfaser ausgewählt ist aus K3, T2, T4, Ox2, RB32-33, AR1, PP01 und RB69.



7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, wobei das Bakteriophagenschwanzprotein eine Homologie auf Aminosäureebene von mindestens 60 % zum T4p12 Protein aufweist.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die  
5 Bakteriophagenschwanzproteine modifiziert sind.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Bakteriophagenschwanzproteine mit enzymatisch aktiven Proteinen kovalent verbunden sind.  
10
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Bakteriophagenschwanzprotein einen Strep-Tag oder einen His-Tag aufweist.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei der Tag eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO.  
15 5, 6 oder 7 aufweist.
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, wobei als Bakteriophagenschwanzprotein das p12-Protein des Phagen T4, K3, T2, Ox2, RB32-33, AR1, PP01 oder RB69 verwendet wird.
- 20 13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Inkubation 0,1  $\mu\text{M}$  bis 10 mM und/oder die  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration 0,1  $\mu\text{M}$  bis 10 mM beträgt.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei markiertes Endotoxin aus  
25 der Bindung mit einem Bakteriophagenschwanzprotein verdrängt wird und das markierte Endotoxin anschließend nachgewiesen wird.
15. Ein Endotoxin-Nachweis-Kit, umfassend einen mit Bakteriophagenschwanzproteinen beschichteten Träger, einen Behälter enthaltend ein Referenzendotoxin zur Messung einer  
30 Standardkurve, einen Behälter mit mindestens einem weiteren Bakteriophagenschwanzprotein oder einem Anti-Lipid A Antikörper.

<110> PROFOS AG

<120> Verfahren zum Nachweis von Endotoxin

<130> PRO-013 PCT

<140> unknown

<141> 2004-12-20

<150> DE 103 60 844.3

<151> 2003-12-20

<160> 15

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 78

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 1

gaaggaacta gtcatatggc tagctggagc caccgcagc tcgaaaaagg cgccagtaat 60

aatacatatc aacacggt 78

<210> 2

<211> 54

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 2

acgcgcaaag cttgtcgagc gatcctatca ttcttttacc ttaattatgt agtt 54

<210> 3

<211> 78

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 3

gaaggaacta gtcatatggc ttgttggagc caccgcagc tcgaaaaagg cgccagtaat 60

aatacatatc aacacggt 78

<210> 4

<211> 78

<212> DNA

<213> artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 4

gaaggaacta gtcatatggc tagctggagc caccgcagc tcgaaaaagg cgcctgtaat 60  
 aatacatatc aacacgtt 78

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; strep tag

&lt;400&gt; 5

Met Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ser Asn Asn  
 1 5 10 15

Thr Tyr Gln

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; strep tag

&lt;400&gt; 6

Met Ala Cys Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ser Asn Asn  
 1 5 10 15

Thr Tyr Gln

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; strep tag

&lt;400&gt; 7

Met Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Cys Asn Asn  
 1 5 10 15

Thr Tyr Gln

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 539

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; T4p12 with strep tag

&lt;400&gt; 8

```

Met Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ser Asn Asn
1          5          10          15

Thr Tyr Gln His Val Ser Asn Glu Ser Arg Tyr Val Lys Phe Asp Pro
          20          25          30

Thr Asp Thr Asn Phe Pro Pro Glu Ile Thr Asp Val Gln Ala Ala Ile
          35          40          45

Ala Ala Ile Ser Pro Ala Gly Val Asn Gly Val Pro Asp Ala Ser Ser
          50          55          60

Thr Thr Lys Gly Ile Leu Phe Leu Ala Thr Glu Gln Glu Val Ile Asp
65          70          75          80

Gly Thr Asn Asn Thr Lys Ala Val Thr Pro Ala Thr Leu Ala Thr Arg
          85          90          95

Leu Ser Tyr Pro Asn Ala Thr Glu Ala Val Tyr Gly Leu Thr Arg Tyr
          100          105          110

Ser Thr Asp Asp Glu Ala Ile Ala Gly Val Asn Asn Glu Ser Ser Ile
          115          120          125

Thr Pro Ala Lys Phe Thr Val Ala Leu Asn Asn Val Phe Glu Thr Arg
          130          135          140

Val Ser Thr Glu Ser Ser Asn Gly Val Ile Lys Ile Ser Ser Leu Pro
145          150          155          160

Gln Ala Leu Ala Gly Ala Asp Asp Thr Thr Ala Met Thr Pro Leu Lys
          165          170          175

Thr Gln Gln Leu Ala Val Lys Leu Ile Ala Gln Ile Ala Pro Ser Lys
          180          185          190

Asn Ala Ala Thr Glu Ser Glu Gln Gly Val Ile Gln Leu Ala Thr Val
          195          200          205

Ala Gln Ala Arg Gln Gly Thr Leu Arg Glu Gly Tyr Ala Ile Ser Pro
          210          215          220

Tyr Thr Phe Met Asn Ser Thr Ala Thr Glu Glu Tyr Lys Gly Val Ile
225          230          235          240

Lys Leu Gly Thr Gln Ser Glu Val Asn Ser Asn Asn Ala Ser Val Ala
          245          250          255

Val Thr Gly Ala Thr Leu Asn Gly Arg Gly Ser Thr Thr Ser Met Arg
          260          265          270

Gly Val Val Lys Leu Thr Thr Thr Ala Gly Ser Gln Ser Gly Gly Asp
          275          280          285

Ala Ser Ser Ala Leu Ala Trp Asn Ala Asp Val Ile His Gln Arg Gly
          290          295          300

Gly Gln Thr Ile Asn Gly Thr Leu Arg Ile Asn Asn Thr Leu Thr Ile
305          310          315          320

```

Ala Ser Gly Gly Ala Asn Ile Thr Gly Thr Val Asn Met Thr Gly Gly  
 325 330 335

Tyr Ile Gln Gly Lys Arg Val Val Thr Gln Asn Glu Ile Asp Arg Thr  
 340 345 350

Ile Pro Val Gly Ala Ile Met Met Trp Ala Ala Asp Ser Leu Pro Ser  
 355 360 365

Asp Ala Trp Arg Phe Cys His Gly Gly Thr Val Ser Ala Ser Asp Cys  
 370 375 380

Pro Leu Tyr Ala Ser Arg Ile Gly Thr Arg Tyr Gly Gly Ser Ser Ser  
 385 390 395 400

Asn Pro Gly Leu Pro Asp Met Arg Gly Leu Phe Val Arg Gly Ser Gly  
 405 410 415

Arg Gly Ser His Leu Thr Asn Pro Asn Val Asn Gly Asn Asp Gln Phe  
 420 425 430

Gly Lys Pro Arg Leu Gly Val Gly Cys Thr Gly Gly Tyr Val Gly Glu  
 435 440 445

Val Gln Lys Gln Gln Met Ser Tyr His Lys His Ala Gly Gly Phe Gly  
 450 455 460

Glu Tyr Asp Asp Ser Gly Ala Phe Gly Asn Thr Arg Arg Ser Asn Phe  
 465 470 475 480

Val Gly Thr Arg Lys Gly Leu Asp Trp Asp Asn Arg Ser Tyr Phe Thr  
 485 490 495

Asn Asp Gly Tyr Glu Ile Asp Pro Ala Ser Gln Arg Asn Ser Arg Tyr  
 500 505 510

Thr Leu Asn Arg Pro Glu Leu Ile Gly Asn Glu Thr Arg Pro Trp Asn  
 515 520 525

Ile Ser Leu Asn Tyr Ile Ile Lys Val Lys Glu  
 530 535

<210> 9  
 <211> 527  
 <212> PRT  
 <213> protein p12 of T2 phage

<400> 9

Met Ser Asn Asn Thr Tyr Gln His Val Ser Asn Glu Ser Arg Tyr Val  
 1 5 10 15

Lys Phe Asp Pro Thr Asp Thr Asn Phe Pro Pro Glu Ile Thr Asp Val  
 20 25 30

Gln Ala Ala Ile Ala Ala Ile Ser Pro Ala Gly Val Asn Gly Val Pro  
 35 40 45

Asp Ala Ser Ser Thr Thr Lys Gly Ile Leu Phe Leu Ala Thr Glu Gln  
 50 55 60

Glu Val Ile Asp Gly Thr Asn Asn Thr Lys Ala Val Thr Pro Ala Thr

65

70

75

80

Leu	Ala	Thr	Arg	Leu	Ser	Tyr	Pro	Asn	Ala	Thr	Glu	Ala	Val	Tyr	Gly	85	90	95
Leu	Thr	Arg	Tyr	Ser	Thr	Asp	Asp	Glu	Ala	Ile	Ala	Gly	Val	Asn	Asn	100	105	110
Glu	Ser	Ser	Ile	Thr	Pro	Ala	Lys	Phe	Thr	Val	Ala	Leu	Asn	Asn	Val	115	120	125
Phe	Glu	Thr	Arg	Val	Ser	Thr	Glu	Ser	Ser	Asn	Gly	Val	Ile	Lys	Ile	130	135	140
Ser	Ser	Leu	Pro	Gln	Ala	Leu	Ala	Gly	Ala	Asp	Asp	Thr	Thr	Ala	Met	145	150	155
Thr	Pro	Leu	Lys	Thr	Gln	Gln	Leu	Ala	Val	Lys	Leu	Ile	Ala	Gln	Ile	165	170	175
Ala	Pro	Ser	Lys	Asn	Ala	Ala	Thr	Glu	Ser	Glu	Gln	Gly	Val	Ile	Gln	180	185	190
Leu	Ala	Thr	Val	Ala	Gln	Ala	Arg	Gln	Gly	Thr	Leu	Arg	Glu	Gly	Tyr	195	200	205
Ala	Ile	Ser	Pro	Tyr	Thr	Phe	Met	Asn	Ser	Thr	Ala	Thr	Glu	Glu	Tyr	210	215	220
Lys	Gly	Val	Ile	Lys	Leu	Gly	Thr	Gln	Ser	Glu	Val	Asn	Ser	Asn	Asn	225	230	235
Ala	Ser	Val	Ala	Val	Thr	Gly	Ala	Thr	Leu	Asn	Gly	Arg	Gly	Ser	Thr	245	250	255
Thr	Ser	Met	Arg	Gly	Val	Val	Lys	Leu	Thr	Thr	Thr	Ala	Gly	Ser	Gln	260	265	270
Ser	Gly	Gly	Asp	Ala	Ser	Ser	Ala	Leu	Ala	Trp	Asn	Ala	Asp	Val	Ile	275	280	285
His	Gln	Arg	Gly	Gly	Gln	Thr	Ile	Asn	Gly	Thr	Leu	Arg	Ile	Asn	Asn	290	295	300
Thr	Leu	Thr	Ile	Ala	Ser	Gly	Gly	Ala	Asn	Ile	Thr	Gly	Thr	Val	Asn	305	310	315
Met	Thr	Gly	Gly	Tyr	Ile	Gln	Gly	Lys	Arg	Val	Val	Thr	Gln	Asn	Glu	325	330	335
Ile	Asp	Arg	Thr	Ile	Pro	Val	Gly	Ala	Ile	Met	Met	Trp	Ala	Ala	Asp	340	345	350
Ser	Leu	Pro	Ser	Asp	Ala	Trp	Arg	Phe	Cys	His	Gly	Gly	Thr	Val	Ser	355	360	365
Ala	Ser	Asp	Cys	Pro	Leu	Tyr	Ala	Ser	Arg	Ile	Gly	Thr	Arg	Tyr	Gly	370	375	380
Gly	Thr	Ser	Ser	Asn	Pro	Gly	Leu	Pro	Asp	Met	Arg	Gly	Leu	Phe	Val	385	390	395
Arg	Gly	Ser	Gly	Arg	Gly	Ser	His	Leu	Thr	Asn	Pro	Asn	Val	Asn	Gly	405	410	415

Asn Asp Gln Phe Gly Lys Pro Arg Leu Gly Val Gly Cys Thr Gly Gly  
 420 425 430  
 Tyr Val Gly Glu Val Gln Lys Gln Gln Met Ser Tyr His Lys His Ala  
 435 440 445  
 Gly Gly Phe Gly Glu Tyr Asp Asp Ser Gly Ala Phe Gly Asn Thr Arg  
 450 455 460  
 Arg Ser Asn Phe Val Gly Thr Arg Lys Gly Leu Asp Trp Asp Asn Arg  
 465 470 475 480  
 Ser Tyr Phe Thr Asn Asp Gly Tyr Glu Ile Asp Pro Ala Ser Gln Arg  
 485 490 495  
 Asn Ser Arg Tyr Thr Leu Asn Arg Pro Glu Leu Ile Gly Asn Glu Thr  
 500 505 510  
 Arg Pro Trp Asn Ile Ser Leu Asn Tyr Ile Ile Lys Val Lys Glu  
 515 520 525

<210> 10  
 <211> 527  
 <212> PRT  
 <213> protein p12 of T4 phage

<400> 10

Met Ser Asn Asn Thr Tyr Gln His Val Ser Asn Glu Ser Arg Tyr Val  
 1 5 10 15  
 Lys Phe Asp Pro Thr Asp Thr Asn Phe Pro Pro Glu Ile Thr Asp Val  
 20 25 30  
 His Ala Ala Ile Ala Ala Ile Ser Pro Ala Gly Val Asn Gly Val Pro  
 35 40 45  
 Asp Ala Ser Ser Thr Thr Lys Gly Ile Leu Phe Ile Pro Thr Glu Gln  
 50 55 60  
 Glu Val Ile Asp Gly Thr Asn Asn Thr Lys Ala Val Thr Pro Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Ala Thr Arg Leu Ser Tyr Pro Asn Ala Thr Glu Thr Val Tyr Gly  
 85 90 95  
 Leu Thr Arg Tyr Ser Thr Asn Asp Glu Ala Ile Ala Gly Val Asn Asn  
 100 105 110  
 Glu Ser Ser Ile Thr Pro Ala Lys Phe Thr Val Ala Leu Asn Asn Ala  
 115 120 125  
 Phe Glu Thr Arg Val Ser Thr Glu Ser Ser Asn Gly Val Ile Lys Ile  
 130 135 140  
 Ser Ser Leu Pro Gln Ala Leu Ala Gly Ala Asp Asp Thr Thr Ala Met  
 145 150 155 160  
 Thr Pro Leu Lys Thr Gln Gln Leu Ala Ile Lys Leu Ile Ala Gln Ile  
 165 170 175  
 Ala Pro Ser Glu Thr Thr Ala Thr Glu Ser Asp Gln Gly Val Val Gln

39



<210> 11  
 <211> 518  
 <212> PRT  
 <213> protein p12 of PP01 phage

<400> 11

Met	Ser	Asn	Asn	Thr	Tyr	Gln	His	Val	Ser	Asn	Glu	Ser	Lys	Tyr	Val	1	5	10	15
Lys	Phe	Asp	Pro	Val	Gly	Ser	Asn	Phe	Pro	Asp	Thr	Val	Thr	Thr	Val	20	25	30	
Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Ile	Ser	Asn	Ile	Gly	Val	Asn	Gly	Ile	Pro	35	40	45	
Asp	Ala	Ser	Met	Glu	Val	Lys	Gly	Ile	Ala	Met	Ile	Ala	Ser	Glu	Gln	50	55	60	
Glu	Val	Leu	Asp	Gly	Thr	Asn	Asn	Ser	Lys	Ile	Val	Thr	Pro	Ala	Thr	65	70	75	80
Leu	Ala	Thr	Arg	Leu	Leu	Tyr	Pro	Asn	Ala	Thr	Glu	Thr	Lys	Tyr	Gly	85	90	95	
Leu	Thr	Arg	Tyr	Ser	Thr	Asn	Glu	Glu	Thr	Leu	Glu	Gly	Ser	Asp	Asn	100	105	110	
Asn	Ser	Ser	Ile	Thr	Pro	Gln	Lys	Leu	Lys	Tyr	His	Thr	Asp	Asp	Val	115	120	125	
Phe	Gln	Asn	Arg	Tyr	Ser	Ser	Glu	Ser	Ser	Asn	Gly	Val	Ile	Lys	Ile	130	135	140	
Ser	Ser	Thr	Pro	Ala	Ala	Leu	Ala	Gly	Val	Asp	Asp	Thr	Thr	Ala	Met	145	150	155	160
Thr	Pro	Leu	Lys	Thr	Gln	Lys	Leu	Ala	Ile	Lys	Leu	Ile	Ser	Gln	Ile	165	170	175	
Ala	Pro	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Arg	Gly	Val	Val	Gln	180	185	190	
Leu	Ser	Thr	Val	Ala	Gln	Thr	Arg	Gln	Gly	Thr	Leu	Arg	Glu	Gly	Tyr	195	200	205	
Ala	Ile	Ser	Pro	Tyr	Thr	Phe	Met	Asn	Ser	Val	Ala	Thr	Gln	Glu	Tyr	210	215	220	
Lys	Gly	Val	Ile	Arg	Leu	Gly	Thr	Gln	Ser	Glu	Ile	Asn	Ser	Asn	Leu	225	230	235	240
Gly	Asp	Val	Ala	Val	Thr	Gly	Glu	Thr	Leu	Asn	Gly	Arg	Gly	Ala	Thr	245	250	255	
Gly	Ser	Met	Arg	Gly	Val	Val	Lys	Leu	Thr	Thr	Gln	Ala	Gly	Ile	Ala	260	265	270	
Pro	Glu	Gly	Asp	Ser	Ser	Gly	Ala	Leu	Ala	Trp	Asn	Ala	Asp	Val	Ile	275	280	285	
Asn	Thr	Arg	Gly	Gly	Gln	Thr	Ile	Asn	Gly	Ser	Leu	Asn	Leu	Asp	His				

290	295	300
Leu Thr Ala Asn Gly Ile Trp Ser Arg Gly Gly Met Trp Lys Asn Gly 305 310 315 320		
Asp Gln Pro Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ala Ser Glu Arg Val Pro Val 325 330 335		
Gly Thr Ile Met Met Phe Ala Gly Asp Ser Ala Pro Pro Gly Trp Ile 340 345 350		
Met Cys His Gly Gly Thr Val Ser Gly Asp Gln Tyr Pro Asp Tyr Arg 355 360 365		
Asn Thr Val Gly Thr Arg Phe Gly Gly Asp Trp Asn Asn Pro Gly Ile 370 375 380		
Pro Asp Met Arg Gly Leu Phe Val Arg Gly Ala Gly Thr Gly Gly His 385 390 395 400		
Ile Leu Asn Gln Arg Gly Gln Asp Gly Tyr Gly Lys Asp Arg Leu Gly 405 410 415		
Val Gly Cys Asp Gly Met His Val Gly Gly Val Gln Ala Gln Gln Ile 420 425 430		
Ser Tyr His Lys His Ala Gly Ala Trp Gly Glu Asn Gly Asn Asn Arg 435 440 445		
Gly Tyr Ala Pro Phe Gly Ala Ser Asn Gly Ser Gly Tyr Leu Gly Asn 450 455 460		
Gly Arg Ser Ala Asp Trp Asp Asn His Leu Phe Phe Thr Asn Asp Gly 465 470 475 480		
Phe Glu Met Gly Gly Pro Arg Asp Ser Phe Gly Thr Leu Asn Arg Glu 485 490 495		
Gly Leu Ile Gly Tyr Glu Thr Arg Pro Trp Asn Ile Ser Leu Asn Tyr 500 505 510		
Ile Ile Lys Ile His Tyr 515		

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 516

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; protein p12 of RB69 phage

&lt;400&gt; 12

Met Ser Asn Asn Thr Tyr Gln His Val Ser Asn Glu Ser Val Tyr Val 1 5 10 15
Glu Phe Asp Pro Thr Gly Ser Asn Phe Asp Ser Ser Ile Thr Asn Val 20 25 30
Gln Ala Ala Leu Ala Ser Ile Ser Ala Tyr Gly Val Lys Gly Val Pro 35 40 45
Asp Ala Ser Glu Ala Glu Lys Gly Val Ile Gln Leu Ala Thr Glu Gln 50 55 60

Glu Val Leu Asp Gly Phe Asn Ser Thr Lys Ala Val Thr Pro Ala Thr	65	70	75	80
Leu Asn Ala Arg Leu Gln Tyr Pro Asn Ala Ser Glu Thr Gln Tyr Gly	85	90	95	
Val Thr Lys Tyr Ala Thr Gln Glu Glu Ala Ile Ala Gly Thr Leu Asp	100	105	110	
Thr Val Ser Ile Thr Pro Leu Lys Leu Asn Gln Thr Ile Asp Asn Thr	115	120	125	
Phe Ser Thr Arg Tyr Ser Thr Glu Thr Thr Asn Gly Val Ile Lys Ile	130	135	140	
Ala Thr Gln Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ser Asp Asp Thr Thr Ala Met	145	150	155	160
Thr Pro Leu Lys Thr Gln Gln Leu Ala Ile Lys Leu Ile Ser Gln Ile	165	170	175	
Ala Pro Asn Asn Asp Pro Ala Ser Glu Ser Ile Thr Gly Val Val Arg	180	185	190	
Leu Ala Thr Val Ala Gln Thr Arg Gln Gly Thr Leu Arg Glu Gly Tyr	195	200	205	
Ala Ile Ser Pro Tyr Thr Phe Met Asn Ser Val Ala Thr Gln Glu Tyr	210	215	220	
Lys Gly Val Ile Arg Leu Gly Thr Gln Ala Glu Ile Asn Ser Asn Leu	225	230	235	240
Gly Asp Val Ala Val Thr Gly Glu Thr Leu Asn Gly Arg Gly Ala Thr	245	250	255	
Gly Ser Met Arg Gly Val Val Lys Leu Thr Thr Gln Ala Gly Val Ala	260	265	270	
Pro Glu Gly Asp Ser Ser Gly Ala Leu Ala Trp Asn Ala Asp Val Ile	275	280	285	
Asn Thr Arg Gly Gly Gln Thr Ile Asn Gly Ser Leu Asn Leu Asp His	290	295	300	
Leu Thr Ala Asn Gly Ile Trp Ser Arg Gly Gly Met Trp Lys Asn Gly	305	310	315	320
Asp Gln Pro Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ala Ser Glu Arg Val Pro Val	325	330	335	
Gly Thr Ile Gln Met Phe Ala Gly Asp Ser Ala Pro Pro Gly Trp Val	340	345	350	
Leu Cys His Gly Gly Thr Ile Ser Gly Asp Gln Phe Pro Asp Tyr Arg	355	360	365	
Asn Val Val Gly Thr Arg Phe Gly Gly Asp Trp Asn Asn Pro Gly Ile	370	375	380	
Pro Asp Met Arg Gly Leu Phe Val Arg Gly Ala Gly Thr Gly Ser His	385	390	395	400
Ile Leu Asn Asn Arg Gly Gln Asp Gly Tyr Gly Lys Asp Arg Leu Gly				

405 410 415  
 Val Gly Cys Asp Gly Met His Val Gly Gly Val Gln Ala Gln Gln Met  
 420 425 430  
 Ser Tyr His Lys His Ala Gly Gly Trp Gly Glu Phe Gln Arg His Glu  
 435 440 445  
 Ala Pro Phe Gly Ala Ser Val Tyr Gln Gly Tyr Leu Gly Thr Arg Lys  
 450 455 460  
 Tyr Ser Asp Trp Asp Asn Ala Ser Tyr Phe Thr Asn Asp Gly Phe Glu  
 465 470 475 480  
 Leu Gly Gly His Arg Asp Ala Thr Gly Thr Leu Asn Arg Glu Gly Leu  
 485 490 495  
 Ile Gly Tyr Glu Thr Arg Pro Trp Asn Ile Ser Leu Asn Tyr Ile Ile  
 500 505 510  
 Lys Val His Tyr  
 515

<210> 13  
 <211> 516  
 <212> PRT  
 <213> protein p12 of AR1 phage

<400> 13

Met Ser Asn Asn Thr Tyr Gln His Val Ser Asn Glu Ser Lys Tyr Val  
 1 5 10 15  
 Lys Phe Asp Pro Thr Gly Ser Asn Phe Pro Asp Thr Val Thr Thr Val  
 20 25 30  
 Gln Ser Ala Leu Ser Lys Ile Ser Asn Ile Gly Val Asn Gly Ile Pro  
 35 40 45  
 Asp Ala Thr Met Glu Val Lys Gly Ile Ala Met Ile Ala Ser Glu Gln  
 50 55 60  
 Glu Val Leu Asp Gly Thr Asn Asn Ser Lys Ile Val Thr Pro Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Ala Thr Arg Leu Leu Tyr Pro Asn Ala Thr Glu Thr Lys Tyr Gly  
 85 90 95  
 Leu Thr Arg Tyr Ser Thr Asn Glu Glu Thr Leu Glu Gly Ser Asp Asn  
 100 105 110  
 Asn Ser Ser Ile Thr Pro Gln Lys Leu Lys Tyr His Thr Asp Asp Val  
 115 120 125  
 Phe Gln Asn Arg Tyr Ser Ser Glu Ser Ser Asn Gly Val Ile Lys Ile  
 130 135 140  
 Ser Ser Thr Pro Ala Ala Leu Ala Gly Val Asp Asp Thr Thr Ala Met  
 145 150 155 160  
 Thr Pro Leu Lys Thr Gln Lys Leu Ala Ile Lys Leu Ile Ser Gln Ile  
 165 170 175

Ala	Pro	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Arg	Gly	Val	Val	Gln	
			180					185					190			
Leu	Ser	Thr	Val	Ala	Gln	Thr	Arg	Gln	Gly	Thr	Leu	Arg	Glu	Gly	Tyr	
		195					200					205				
Ala	Ile	Ser	Pro	Tyr	Thr	Phe	Met	Asn	Ser	Val	Ala	Thr	Gln	Glu	Tyr	
	210					215					220					
Lys	Gly	Val	Ile	Arg	Leu	Gly	Thr	Gln	Ser	Glu	Ile	Asn	Ser	Asn	Leu	
225					230					235					240	
Gly	Asp	Val	Ala	Val	Thr	Gly	Gly	Thr	Leu	Asn	Gly	Arg	Gly	Ala	Thr	
				245					250					255		
Gly	Ser	Met	Arg	Gly	Val	Val	Lys	Leu	Thr	Thr	Gln	Ala	Gly	Ile	Ala	
			260					265					270			
Pro	Glu	Gly	Asp	Ser	Ser	Gly	Ala	Leu	Ala	Trp	Asn	Ala	Asp	Val	Ile	
		275					280					285				
Asn	Thr	Arg	Gly	Gly	Gln	Thr	Ile	Asn	Gly	Ser	Leu	Asn	Leu	Asp	His	
	290					295					300					
Leu	Thr	Ala	Asn	Gly	Ile	Trp	Ser	Arg	Gly	Gly	Met	Trp	Lys	Asn	Gly	
305					310					315					320	
Asp	Gln	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Arg	Tyr	Ala	Ser	Glu	Arg	Val	Pro	Val	
				325					330					335		
Gly	Thr	Ile	Met	Met	Phe	Ala	Gly	Asp	Ser	Ala	Pro	Pro	Gly	Trp	Ile	
			340					345					350			
Met	Cys	His	Gly	Gly	Thr	Val	Ser	Gly	Asp	Gln	Tyr	Pro	Asp	Tyr	Arg	
		355					360					365				
Asn	Thr	Val	Gly	Thr	Arg	Phe	Gly	Gly	Asp	Trp	Asn	Asn	Pro	Gly	Ile	
	370					375					380					
Pro	Asp	Met	Arg	Gly	Leu	Phe	Val	Arg	Gly	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly	His	
385					390					395					400	
Ile	Leu	Asn	Gln	Arg	Gly	Gln	Asp	Gly	Tyr	Gly	Lys	Asp	Arg	Leu	Gly	
				405					410					415		
Val	Gly	Cys	Asp	Gly	Met	His	Val	Gly	Gly	Val	Gln	Ala	Gln	Gln	Met	
			420					425					430			
Ser	Tyr	His	Lys	His	Ala	Gly	Gly	Trp	Gly	Glu	Tyr	Asn	Arg	Ser	Glu	
		435					440					445				
Gly	Pro	Phe	Gly	Ala	Ser	Val	Tyr	Gln	Gly	Tyr	Leu	Gly	Thr	Arg	Lys	
	450					455					460					
Tyr	Ser	Asp	Trp	Asp	Asn	Ala	Ser	Tyr	Phe	Thr	Asn	Asp	Gly	Phe	Glu	
465					470					475					480	
Leu	Gly	Gly	Pro	Arg	Asp	Ala	Leu	Gly	Thr	Leu	Asn	Arg	Glu	Gly	Leu	
				485					490					495		
Ile	Gly	Tyr	Glu	Thr	Arg	Pro	Trp	Asn	Ile	Ser	Leu	Asn	Tyr	Ile	Ile	
			500					505					510			
Lys	Ile	His	Tyr													

515

<210> 14  
 <211> 527  
 <212> PRT  
 <213> protein p12 of K3 phage

<400> 14

```

Met Ser Asn Asn Thr Tyr Gln His Val Ser Asn Glu Ser Arg Tyr Val
1          5          10          15

Lys Phe Asp Pro Thr Asp Thr Asn Phe Pro Pro Glu Ile Thr Asp Val
          20          25          30

Gln Ala Ala Ile Ala Ala Ile Ser Pro Ala Gly Val Asn Gly Val Pro
          35          40          45

Asp Ala Ser Ser Thr Thr Lys Gly Ile Leu Phe Leu Ala Thr Glu Gln
          50          55          60

Glu Val Ile Asp Gly Thr Asn Asn Thr Lys Ala Val Thr Pro Ala Thr
65          70          75          80

Leu Ala Thr Arg Leu Ser Tyr Pro Asn Ala Thr Glu Thr Val Tyr Gly
          85          90          95

Leu Thr Arg Tyr Ser Thr Asn Asp Glu Ala Ile Ala Gly Val Asn Asn
          100          105          110

Glu Ser Ser Ile Thr Pro Ala Lys Phe Thr Val Ala Leu Asn Asn Ala
          115          120          125

Phe Glu Thr Arg Val Ser Thr Glu Ser Ser Asn Gly Val Ile Lys Ile
          130          135          140

Ser Ser Leu Pro Gln Ala Leu Ala Gly Ala Asp Asp Thr Thr Ala Met
145          150          155          160

Thr Pro Leu Lys Thr Gln Gln Leu Ala Ile Lys Leu Ile Ala Gln Ile
          165          170          175

Ala Pro Ser Glu Thr Thr Ala Thr Glu Ser Asp Gln Gly Val Val Gln
          180          185          190

Leu Ala Thr Val Ala Gln Val Arg Gln Gly Thr Leu Arg Glu Gly Tyr
          195          200          205

Ala Ile Ser Pro Tyr Thr Phe Met Asn Ser Ser Ala Thr Glu Glu Tyr
          210          215          220

Lys Gly Val Ile Lys Leu Gly Thr Gln Ser Glu Val Asn Ser Asn Asn
225          230          235          240

Ala Ser Val Ala Val Thr Gly Ala Thr Leu Asn Gly Arg Gly Ser Thr
          245          250          255

Thr Ser Met Arg Gly Val Val Arg Leu Thr Thr Thr Ala Gly Ser Gln
          260          265          270

Ser Gly Gly Asp Ala Ser Ser Ala Leu Ala Trp Asn Ala Asp Val Ile
          275          280          285

```

His Gln Arg Gly Gly Gln Thr Ile Asn Gly Thr Leu Arg Ile Asn Asn  
 290 295 300  
 Thr Leu Thr Ile Ala Ser Gly Gly Ala Asn Ile Thr Gly Thr Val Asn  
 305 310 315 320  
 Met Thr Gly Gly Tyr Ile Gln Gly Lys Arg Val Val Thr Gln Asn Glu  
 325 330 335  
 Ile Asp Arg Thr Ile Pro Val Gly Ala Ile Met Met Trp Ala Ala Asp  
 340 345 350  
 Ser Leu Pro Ser Asp Ala Trp Arg Phe Cys His Gly Gly Thr Val Ser  
 355 360 365  
 Ala Ser Asp Cys Pro Leu Tyr Ala Ser Arg Ile Gly Thr Arg Tyr Gly  
 370 375 380  
 Gly Ser Ser Ser Asn Pro Gly Leu Pro Asp Met Arg Gly Leu Phe Val  
 385 390 395 400  
 Arg Gly Ser Gly Arg Gly Ser His Leu Thr Asn Pro Asn Val Asn Gly  
 405 410 415  
 Asn Asp Gln Phe Gly Lys Pro Arg Leu Gly Val Gly Cys Thr Gly Gly  
 420 425 430  
 Tyr Val Gly Glu Val Gln Lys Gln Gln Met Ser Tyr His Lys His Ala  
 435 440 445  
 Gly Gly Phe Gly Glu Trp Asp Asp Ser Gly Ala Phe Gly Asn Thr Arg  
 450 455 460  
 Arg Ser Asn Phe Val Gly Thr Arg Lys Gly Leu Asp Trp Asp Asn Arg  
 465 470 475 480  
 Ser Tyr Phe Thr Asn Asp Gly Tyr Glu Ile Asp Pro Ala Ser Gln Arg  
 485 490 495  
 Asn Ser Arg Tyr Thr Leu Asn Arg Pro Glu Leu Ile Gly Asn Glu Thr  
 500 505 510  
 Arg Pro Trp Asn Ile Ser Leu Asn Tyr Ile Ile Lys Val Lys Glu  
 515 520 525

<210> 15  
 <211> 516  
 <212> PRT  
 <213> protein p12 of RB32-33 phage

<400> 15

Met Ser Asn Asn Thr Tyr Gln His Val Ser Asn Glu Ser Lys Tyr Val  
 1 5 10 15  
 Lys Phe Asp Pro Val Gly Ser Asn Phe Pro Asp Thr Val Thr Thr Val  
 20 25 30  
 Gln Ser Ala Leu Ser Lys Ile Ser Asn Ile Gly Val Asn Gly Ile Pro  
 35 40 45  
 Asp Ala Thr Met Glu Val Lys Gly Ile Ala Met Ile Ala Ser Glu Gln  
 50 55 60

Glu	Val	Leu	Asp	Gly	Thr	Asn	Asn	Ser	Lys	Ile	Val	Thr	Pro	Ala	Thr	65	70	75	80
Leu	Ala	Thr	Arg	Leu	Leu	Tyr	Pro	Asn	Ala	Thr	Glu	Thr	Lys	Tyr	Gly	85	90	95	
Leu	Thr	Arg	Tyr	Ser	Thr	Asn	Glu	Glu	Thr	Leu	Glu	Gly	Ser	Asp	Asn	100	105	110	
Asn	Ser	Ser	Ile	Thr	Pro	Gln	Lys	Leu	Lys	Tyr	His	Thr	Asp	Asp	Val	115	120	125	
Phe	Gln	Asn	Arg	Tyr	Ser	Ser	Glu	Ser	Ser	Asn	Gly	Val	Ile	Lys	Ile	130	135	140	
Ser	Ser	Thr	Pro	Ala	Ala	Leu	Ala	Gly	Val	Asp	Asp	Thr	Thr	Ala	Met	145	150	155	160
Thr	Pro	Leu	Lys	Thr	Gln	Lys	Leu	Ala	Ile	Lys	Leu	Ile	Ser	Gln	Ile	165	170	175	
Ala	Pro	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Arg	Gly	Val	Val	Gln	180	185	190	
Leu	Ser	Thr	Val	Ala	Gln	Thr	Arg	Gln	Gly	Thr	Leu	Arg	Glu	Gly	Tyr	195	200	205	
Ala	Ile	Ser	Pro	Tyr	Thr	Phe	Met	Asn	Ser	Val	Ala	Thr	Gln	Glu	Tyr	210	215	220	
Lys	Gly	Val	Ile	Arg	Leu	Gly	Thr	Gln	Ser	Glu	Ile	Asn	Ser	Asn	Leu	225	230	235	240
Gly	Asp	Val	Ala	Val	Thr	Gly	Glu	Thr	Leu	Asn	Gly	Arg	Gly	Ala	Thr	245	250	255	
Ser	Ser	Met	Arg	Gly	Val	Val	Lys	Leu	Thr	Thr	Gln	Ala	Gly	Ile	Ala	260	265	270	
Pro	Glu	Gly	Asp	Gly	Ser	Gly	Ala	Leu	Ala	Trp	Asn	Ala	Asp	Val	Ile	275	280	285	
Asn	Thr	Arg	Gly	Gly	Gln	Thr	Ile	Asn	Gly	Ser	Leu	Asn	Leu	Asp	His	290	295	300	
Leu	Thr	Ala	Asn	Gly	Ile	Trp	Ser	Arg	Gly	Gly	Met	Trp	Lys	Asn	Gly	305	310	315	320
Asp	Gln	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Arg	Tyr	Ala	Ser	Glu	Arg	Val	Pro	Val	325	330	335	
Gly	Thr	Ile	Met	Met	Phe	Ala	Gly	Asp	Ser	Ala	Pro	Pro	Gly	Trp	Ile	340	345	350	
Met	Cys	His	Gly	Gly	Thr	Val	Ser	Gly	Asp	Gln	Tyr	Pro	Asp	Tyr	Arg	355	360	365	
Asn	Thr	Val	Gly	Ala	Arg	Phe	Gly	Gly	Asp	Trp	Asn	Asn	Pro	Gly	Ile	370	375	380	
Pro	Asp	Met	Arg	Gly	Leu	Phe	Val	Arg	Gly	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly	His	385	390	395	400



Ile Leu Asn Gln Arg Gly Gln Asp Gly Tyr Gly Lys Asp Arg Leu Gly  
 405 410 415  
 Val Gly Cys Asp Gly Met His Val Gly Gly Val Gln Ala Gln Gln Met  
 420 425 430  
 Ser Tyr His Lys His Ala Gly Gly Trp Gly Glu Tyr Gln Arg His Glu  
 435 440 445  
 Ala Pro Phe Gly Ala Ser Val Tyr Gln Gly Tyr Leu Gly Thr Arg Lys  
 450 455 460  
 Tyr Ser Asp Trp Asp Asn Ala Ser Tyr Phe Thr Asn Asp Gly Phe Glu  
 465 470 475 480  
 Leu Gly Gly Pro Arg Asp Ala Leu Gly Thr Leu Asn Arg Glu Gly Leu  
 485 490 495  
 Ile Gly Tyr Glu Thr Arg Pro Trp Asn Ile Ser Leu Asn Tyr Ile Ile  
 500 505 510  
 Lys Ile His Tyr  
 515

Fig. 1

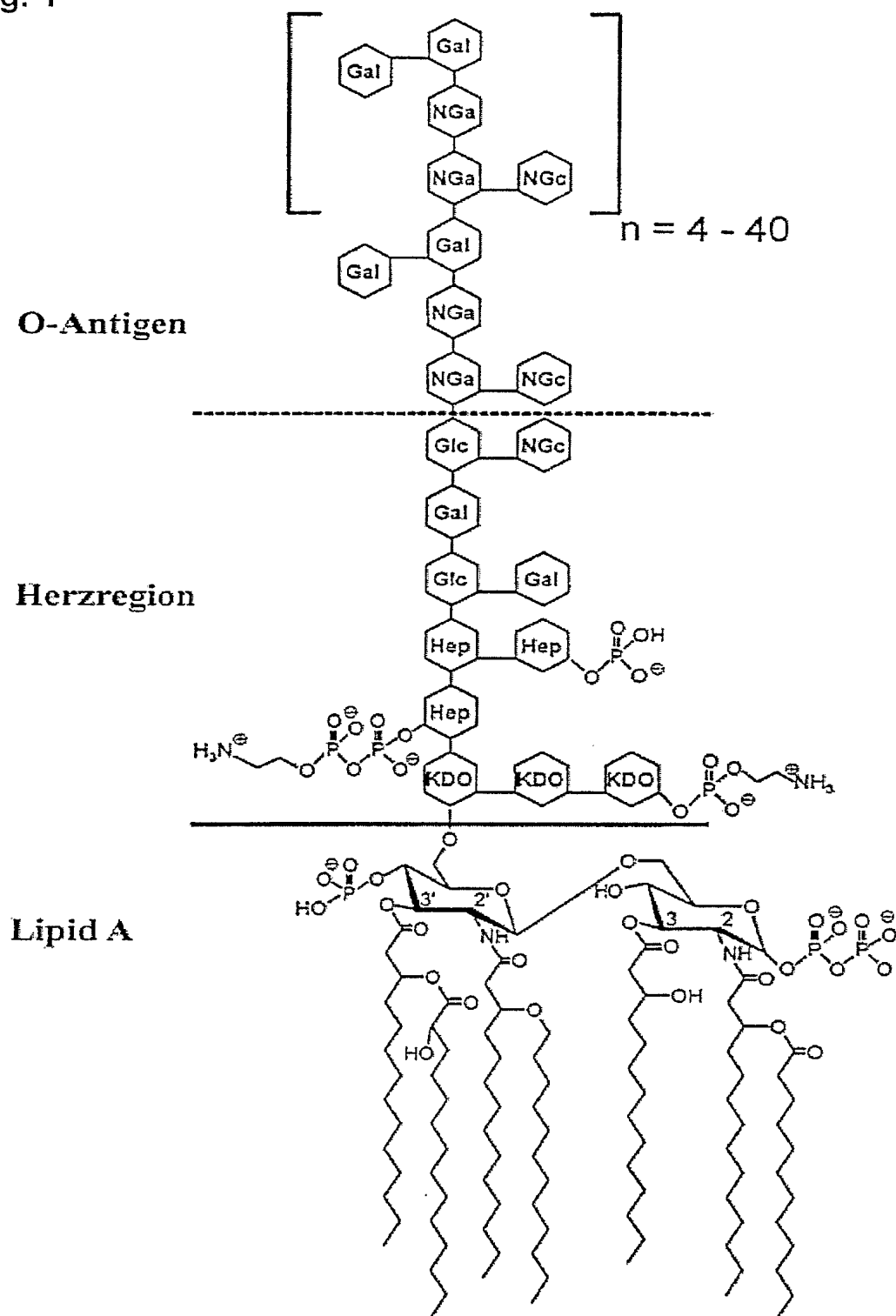


Fig. 2

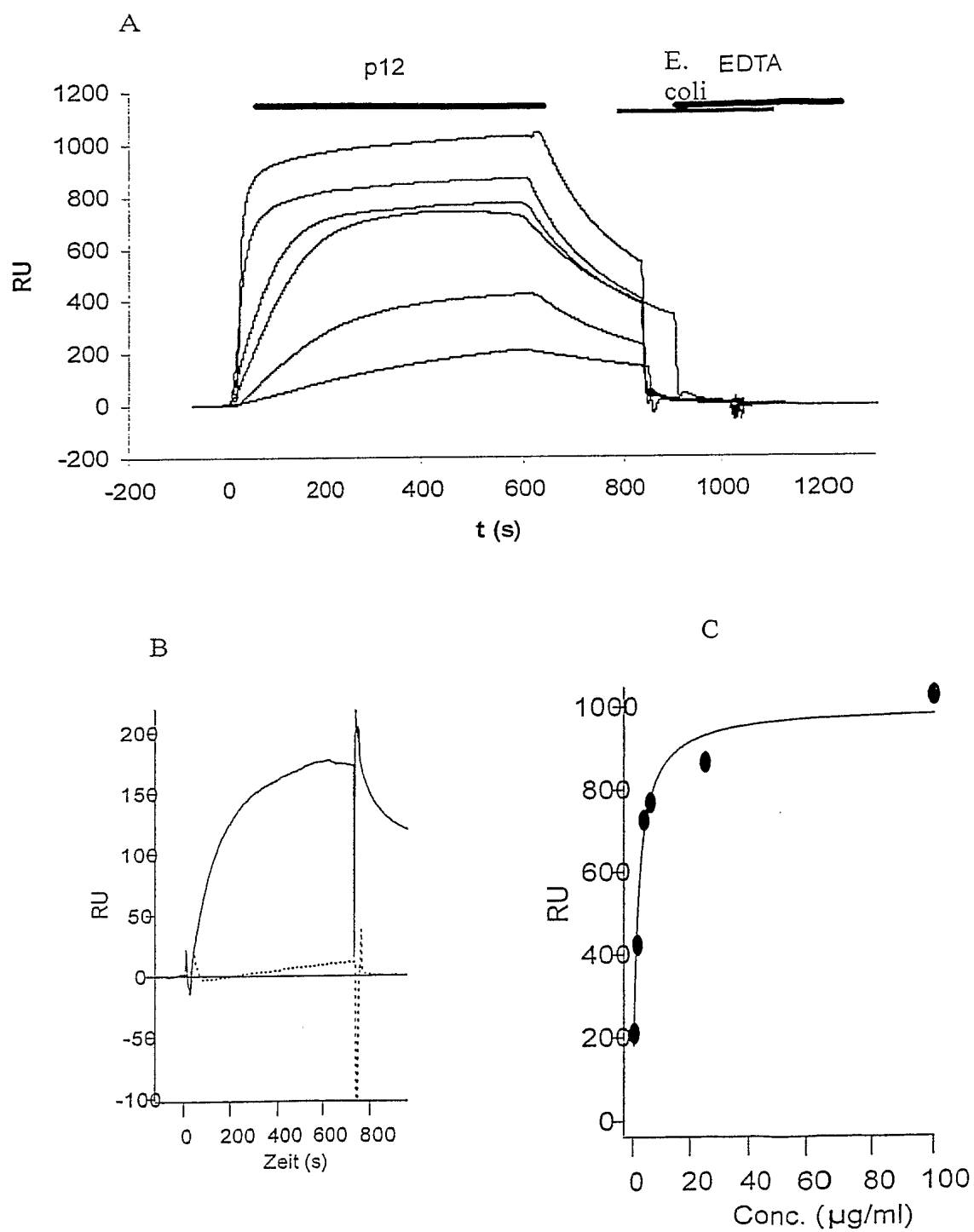


Fig. 3

Endotoxin-Struktur	<i>E. coli</i> Stamm	p12-Bindung
<pre>       KDO-LipidA               KDO               KDO           </pre>	D21f2	-
<pre>       Hep-Hep-KDO-LipidA                   Hep KDO                       KDO           </pre>	D21f1	+
<pre>       Glc-Hep-Hep-KDO-LipidA                   Hep KDO                       KDO           </pre>	D21e8	+
<pre>       Glc-Hep-Hep-KDO-LipidA                   Gal Hep KDO                       KDO           </pre>	D21e7	+
<pre>       GlcN-Glc-Glc-Glc-Glc-Hep-Hep-KDO-LipidA                   Gal Hep KDO                       KDO           </pre>	D21	+

pH	K <sub>d</sub>
6,0	3,09 E-07
7,5	6,85 E-08
8,0	5,86 E-08
8,5	7,86 E-08
9,0	3,29 E-08
10,0	1,55 E-07

Fig. 4

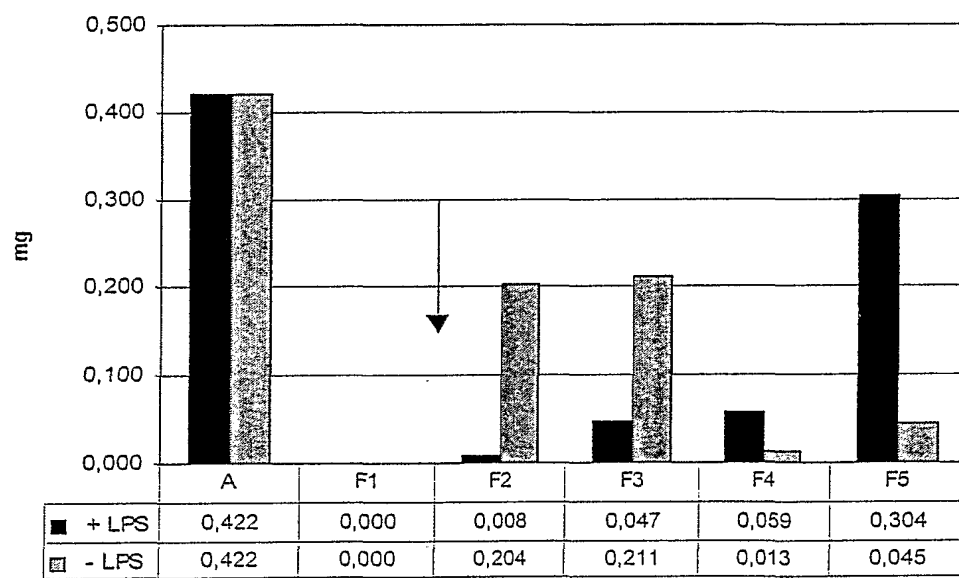
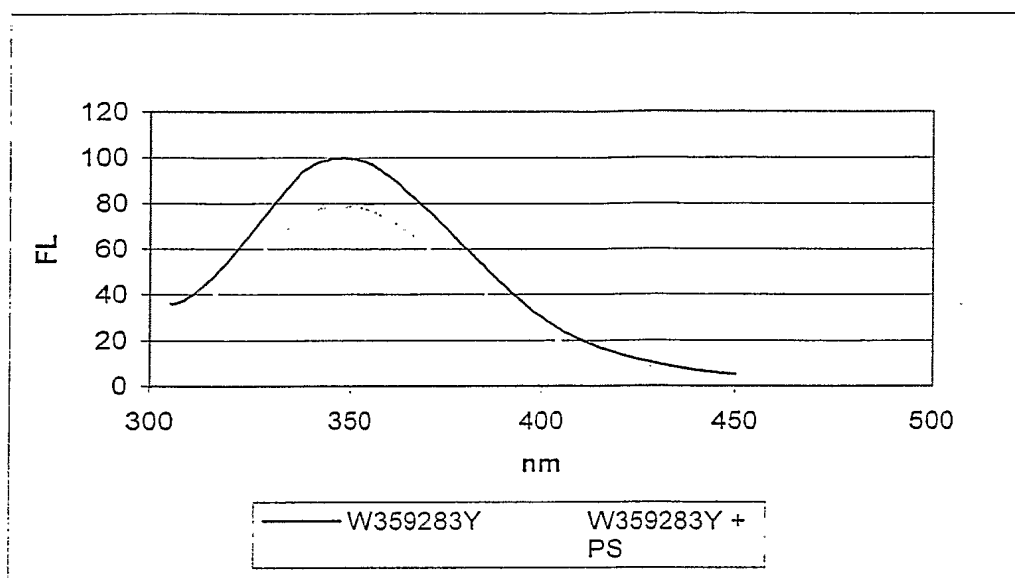


Fig. 5 A



B

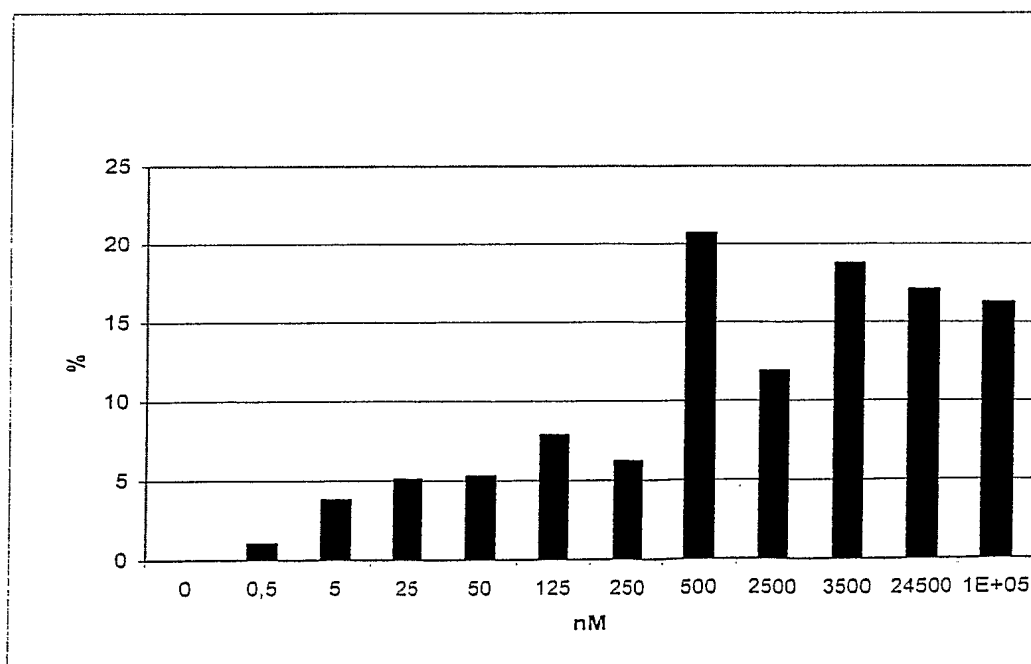
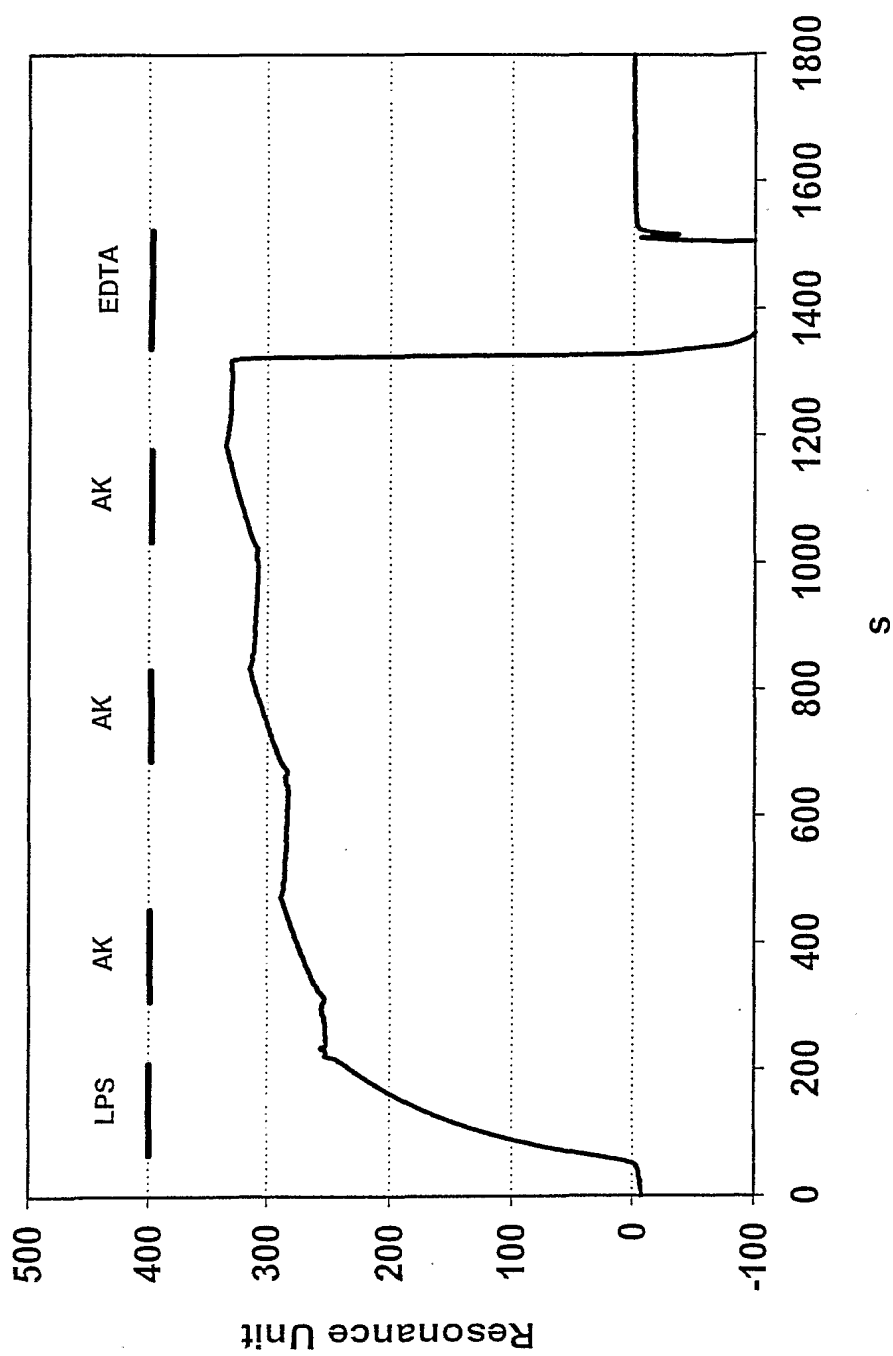


Fig. 6



T2p12	MSNNTYQHVS NESRYVKFDPDPTD TNFPPEITDVQAAIAAISPAGVNGVPDASSTTKGILFL
K3p12	MSNNTYQHVS NESRYVKFDPDPTD TNFPPEITDVQAAIAAISPAGVNGVPDASSTTKGILFL
T4p12	MSNNTYQHVS NESRYVKFDPDPTD TNFPPEITDVHAAIAAISPAGVNGVPDASSTTKGILFI
RB32-33p12	MSNNTYQHVS NESKYVKFDPVGSNFPD TVTTVQSALS KISNIGVNGIPDATMEVKG IAMI
AR1p12	MSNNTYQHVS NESKYVKFDP TGSNFPD TVTTVQSALS KISNIGVNGIPDATMEVKG IAMI
PP01p12	MSNNTYQHVS NESKYVKFDPVGSNFPD TVTTVQSALS KISNIGVNGIPDASMEVKG IAMI
RB69p12	MSNNTYQHVS NESVYVEFDP TGSNFDSS ITNVQAALASISAYGVKGVPDASEAEKGVIQL ***** ** : *** . : ** : * * : : : ** ** : : : : : ** : : : : *
T2p12	ATEQEVIDGTNNTKAVTPATLATRLSYPNATEAVYGLTRYSTDDEAIAGVNNESSITPAK
K3p12	ATEQEVIDGTNNTKAVTPATLATRLSYPNATEVYGLTRYSTDDEAIAGVNNESSITPAK
T4p12	PTEQEVIDGTNNTKAVTPATLATRLSYPNATEVYGLTRYSTDDEAIAGVNNESSITPAK
RB32-33p12	ASEQEVL DGTNNSKI VTPATLATRL LYPNATE TKYGLTRYSTNEETLEGS DNNSSITPQK
AR1p12	ASEQEVL DGTNNSKI VTPATLATRL LYPNATE TKYGLTRYSTNEETLEGS DNNSSITPQK
PP01p12	ASEQEVL DGTNNSKI VTPATLATRL LYPNATE TKYGLTRYSTNEETLEGS DNNSSITPQK
RB69p12	ATEQEVL DGFNSTKAVTPATLNARLQYPNASE TQYGVTKYATQEEAIAGTLDTVSITPLK .: *** : ** * . : * ***** : ** ***** : * : ** : * : : : : : * : : ***** *
T2p12	FTVALN N VFETR VSTESSNGVIKISSLPQALAGADDTTAMT PLKTQQLAVKLI AQIAPSK
K3p12	FTVALN NAFETR VSTESSNGVIKISSLPQALAGADDTTAMT PLKTQQLAIKLI AQIAPSE
T4p12	FTVALN NAFETR VSTESSNGVIKISSLPQALAGADDTTAMT PLKTQQLAIKLI AQIAPSE
RB32-33p12	LKYHTDD V FQNRYSSESSNGVIKISSTPAALAGVDDTTAMT PLKTQQLAIKLI SQIAPSE
AR1p12	LKYHTDD V FQNRYSSESSNGVIKISSTPAALAGVDDTTAMT PLKTQQLAIKLI SQIAPSE
PP01p12	LKYHTDD V FQNRYSSESSNGVIKISSTPAALAGVDDTTAMT PLKTQQLAIKLI SQIAPSE
RB69p12	LNQTI DNTFSTRYSTETTINGVIKIATQTAALAGSDTTAMT PLKTQQLAIKLI SQIAPNN : . : . : * . . * * : : : : ***** : : . ***** ***** : : : : : : : : *
T2p12	NAATESEQGVIQLATVAQARQGT LREGYAI SPYTFMNSTATEEYKGVIKLGTQSEVNSNN
K3p12	TTATESDQGVVQLATVAQVRQGT LREGYAI SPYTFMNSSATEEYKGVIKLGTQSEVNSNN
T4p12	TTATESDQGVVQLATVAQVRQGT LREGYAI SPYTFMNSSATEEYKGVIKLGTQSEVNSNN
RB32-33p12	DTASESVRGVVQLSTVAQTRQGT LREGYAI SPYTFMNSVATQEYKGVIRLGTQSEINSNL
AR1p12	DTASESVRGVVQLSTVAQTRQGT LREGYAI SPYTFMNSVATQEYKGVIRLGTQSEINSNL
PP01p12	DTASESVRGVVQLSTVAQTRQGT LREGYAI SPYTFMNSVATQEYKGVIRLGTQSEINSNL
RB69p12	DPASESITGVVRLATVAQTRQGT LREGYAI SPYTFMNSVATQEYKGVIRLGTQAEINSNL .* : ** ** : : : : ***** ***** : : : : : : : : : : *
T2p12	ASVAVTGATLNGRGSTTSMRGVVKLT TTAGSQSGGDASSALAWNADV IHQRRGGQTINGTL
K3p12	ASVAVTGATLNGRGSTTSMRGVVKLT TTAGSQSGGDASSALAWNADV IHQRRGGQTINGTL
T4p12	ASVAVTGATLNGRGSTTSMRGVVKLT TTAGSQSGGDASSALAWNADV IQRRGGQIIYGT L
RB32-33p12	GDVAVTGETLNGRGATSSMRGVVKLT TQAGIAPEGDSSGALAWNADV INTRGGQTINGSL
AR1p12	GDVAVTGETLNGRGATSSMRGVVKLT TQAGIAPEGDSSGALAWNADV INTRGGQTINGSL
PP01p12	GDVAVTGETLNGRGATSSMRGVVKLT TQAGIAPEGDSSGALAWNADV INTRGGQTINGSL
RB69p12	GDVAVTGETLNGRGATSSMRGVVKLT TQAGVAPEGDSSGALAWNADV INTRGGQTINGSL .. ***** ***** : * ***** : ** ** . ** . * . ***** : ***** * * : *
T2p12	RINNTLTIASGGANITGTVMNTGGYIQGKRVVTQNEIDRTIPVGAIMMWAADSLPSDAWR
K3p12	RINNTLTIASGGANITGTVMNTGGYIQGKRVVTQNEIDRTIPVGAIMMWAADSLPSDAWR
T4p12	RIEDTFTIANGGANITGTVRMTGGYIQGNRIVTQNEIDRTIPVGAIMMWAADSLPSDAWR
RB32-33p12	NLD---HLTANGIWSRGGMWKNG---DQPVATERYASERVPVGTIMMFAGDSAP-PGWI
AR1p12	NLD---HLTANGIWSRGGMWKNG---DQPVATERYASERVPVGTIMMFAGDSAP-PGWI
PP01p12	NLD---HLTANGIWSRGGMWKNG---DQPVATERYASERVPVGTIMMFAGDSAP-PGWI
RB69p12	NLD---HLTANGIWSRGGMWKNG---DQPVATERYASERVPVGTIQMFAGDSAP-PGWV .: : : : : * : : * : : * : : : : : : : : : : * : : * : : *



Fig. 7B

T2p12	FCHGGTVSASDCPLYASRIGTRYGGTSSNPGLPDMRGLFVRGSGRGSHLTNPVNGNDQF
K3p12	FCHGGTVSASDCPLYASRIGTRYGGSSSNPGLPDMRGLFVRGSGRGSHLTNPVNGNDQF
T4p12	FCHGGTVSASDCPLYASRIGTRYGGNPSNPGLPDMRGLFVRGSGRGSHLTNPVNGNDQF
RB32-33p12	MCHGGTVSGDQYPDYRNTVGARFGGDWNNPGIPDMRGLFVRGAGTGGHILNQ--RGQDGY
AR1p12	MCHGGTVSGDQYPDYRNTVGTRFGGDWNNPGIPDMRGLFVRGAGTGGHILNQ--RGQDGY
PP01p12	MCHGGTVSGDQYPDYRNTVGTRFGGDWNNPGIPDMRGLFVRGAGTGXHILNQ--RGQDGY
RB69p12	LCHGGTISGDQFPDYRNVVGTRFGGDWNNPGIPDMRGLFVRGAGTGSHILNN--RGQDGY
	:*****:*.:. : * * . :*:*:** .***:*****:* * *: * .*:* :
T2p12	GKPRLGVGCTGGYVGEVQKQQMSYHKHAGGFGEY---DDSGAFGNTRRSNFGVTRKGLDW
K3p12	GKPRLGVGCTGGYVGEVQKQQMSYHKHAGGFGEW---DDSGAFGNTRRSNFGVTRKGLDW
T4p12	GKPRLGVGCTGGYVGEVQIQQMSYHKHAGGFGEH---DDLGAFGNTRRSNFGVTRKGLDW
RB32-33p12	GKDRLGVGCDGMHVGGVQAQQMSYHKHAGGWGEY--QRHEAPFGASVYQGYLGTRKYSW
AR1p12	GKDRLGVGCDGMHVGGVQAQQMSYHKHAGGWGEY--NRSEGPFGASVYQGYLGTRKYSW
PP01p12	GKDRLGVGCDGMHVGGVQAQQISYHKHAGAWGENGNRRGYAPFGASNGSGYLGNGRSADW
RB69p12	GKDRLGVGCDGMHVGGVQAQQMSYHKHAGGWGEF--QRHEAPFGASVYQGYLGTRKYSW
	** ***** * :** ** **:*****.:** .** : .:.*. : **
T2p12	DNRSYFTNDGYEIDPASQRNSRYTLNRPELIGNETRPWNISLNYIIKVKE
K3p12	DNRSYFTNDGYEIDPASQRNSRYTLNRPELIGNETRPWNISLNYIIKVKE
T4p12	DNRSYFTNDGYEIDPESQRNSKYTLNRPELIGNETRPWNISLNYIIKVKE
RB32-33p12	DNASYFTNDGFELG--GPRDALGTLNREGLIGYETRPWNISLNYIIKIHY
AR1p12	DNASYFTNDGFELG--GPRDALGTLNREGLIGYETRPWNISLNYIIKIHY
PP01p12	DNHLFFFTNDGFEMG--GPRDSFGTLNREGLIGYETRPWNISLNYIIKIHY
RB69p12	DNASYFTNDGFELG--GHRDATGTLNREGLIGYETRPWNISLNYIIKVHY
	** :*****:*.:. . *: : **** *** *****: :

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE2004/002778

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 G01N33/569 G01N33/92

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2004/001418 A (PROFOS AG; SCHUETZ, MICHAEL; MEYER, ROMAN; GRALLERT, HOLGER; MILLER, S) 31 December 2003 (2003-12-31) the whole document	1, 2, 5-15
X	WO 03/000888 A (PROFOS AG; KARETH, MICHAEL, SCHUETZ; GRASSL, RENATE; MEYER, ROMAN; FRI) 3 January 2003 (2003-01-03) the whole document insbesonders Seite 8, Zeile 2 - Seite 14, Zeile 9; Seite 15, Zeile 32 - Seite 16, Zeile 7. ----- -/--	1, 2, 5-15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 June 2005

Date of mailing of the international search report

17/06/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Thumb, W

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE2004/002778

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>THOMASSEN E ET AL: "The Structure of the Receptor-binding Domain of the Bacteriophage T4 Short Tail Fibre Reveals a Knitted Trimeric Metal-binding Fold" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 331, no. 2, 8 August 2003 (2003-08-08), pages 361-373, XP004441503 ISSN: 0022-2836 abstract page 363, column 2, paragraph 2 - page 364, column 1, paragraph 1 page 367, column 1, paragraph 5 - column 2, paragraph 4</p> <p>-----</p>	1-15
Y	<p>BAXA ULRICH ET AL: "Enthalpic barriers to the hydrophobic binding of oligosaccharides to phage P22 tailspike protein" BIOCHEMISTRY, vol. 40, no. 17, 1 May 2001 (2001-05-01), pages 5144-5150, XP002330689 ISSN: 0006-2960 abstract page 5146, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 1</p> <p>-----</p>	1-15
Y	<p>US 6 436 653 B1 (JAKOBSEN MOGENS HAVSTEEN ET AL) 20 August 2002 (2002-08-20) the whole document insbesonders Spalte 19, Zeilen 7-67; Beispiele 21 und 28.</p> <p>-----</p>	3,4
A	<p>SUN W ET AL: "USE OF BIOLUMINESCENT SALMONELLA FOR ASSESSING THE EFFICIENCY OF CONSTRUCTED PHAGE-BASED BIOSORBENT" JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, BASINGSTOKE, GB, vol. 25, no. 5, November 2000 (2000-11), pages 273-275, XP008016601 ISSN: 1367-5435</p> <p>-----</p>	1-15

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE2004/002778

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004001418	A	31-12-2003	DE 10228133 A1	22-01-2004
			DE 10307793 A1	02-09-2004
			AU 2003250270 A1	06-01-2004
			CA 2490467 A1	31-12-2003
			WO 2004001418 A2	31-12-2003
			DE 10393326 D2	02-06-2005
			EP 1516188 A2	23-03-2005
WO 03000888	A	03-01-2003	DE 10129815 A1	09-01-2003
			CA 2450572 A1	03-01-2003
			WO 03000888 A2	03-01-2003
			EP 1399551 A2	24-03-2004
			US 2004248298 A1	09-12-2004
US 6436653	B1	20-08-2002	US 2002128381 A1	12-09-2002
			AU 1650100 A	03-07-2000
			BR 9916330 A	11-09-2001
			CA 2355292 A1	22-06-2000
			CN 1335936 A	13-02-2002
			WO 0036419 A1	22-06-2000
			EP 1141718 A1	10-10-2001
			JP 2002532719 T	02-10-2002
			MX PA01006106 A	21-07-2003
			NZ 512295 A	25-07-2003

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 G01N33/569 G01N33/92

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	WO 2004/001418 A (PROFOS AG; SCHUETZ, MICHAEL; MEYER, ROMAN; GRALLERT, HOLGER; MILLER, S) 31. Dezember 2003 (2003-12-31) das ganze Dokument	1,2,5-15
X	WO 03/000888 A (PROFOS AG; KARETH, MICHAEL, SCHUETZ; GRASSL, RENATE; MEYER, ROMAN; FRI) 3. Januar 2003 (2003-01-03) das ganze Dokument insbesondere Seite 8, Zeile 2 - Seite 14, Zeile 9; Seite 15, Zeile 32 - Seite 16, Zeile 7. ----- -/--	1,2,5-15



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

<sup>o</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. Juni 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

17/06/2005

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Thumb, W

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>THOMASSEN E ET AL: "The Structure of the Receptor-binding Domain of the Bacteriophage T4 Short Tail Fibre Reveals a Knitted Trimeric Metal-binding Fold" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, Bd. 331, Nr. 2, 8. August 2003 (2003-08-08), Seiten 361-373, XP004441503 ISSN: 0022-2836 Zusammenfassung Seite 363, Spalte 2, Absatz 2 - Seite 364, Spalte 1; Absatz 1 Seite 367, Spalte 1, Absatz 5 - Spalte 2, Absatz 4</p>	1-15
Y	<p>----- BAXA ULRICH ET AL: "Enthalpic barriers to the hydrophobic binding of oligosaccharides to phage P22 tailspike protein" BIOCHEMISTRY, Bd. 40, Nr. 17, 1. Mai 2001 (2001-05-01), Seiten 5144-5150, XP002330689 ISSN: 0006-2960 Zusammenfassung Seite 5146, Spalte 1, Absatz 2 - Spalte 2, Absatz 1</p>	1-15
Y	<p>----- US 6 436 653 B1 (JAKOBSEN MOGENS HAVSTEEN ET AL) 20. August 2002 (2002-08-20) das ganze Dokument insbesondere Spalte 19, Zeilen 7-67; Beispiele 21 und 28.</p>	3,4
A	<p>----- SUN W ET AL: "USE OF BIOLUMINESCENT SALMONELLA FOR ASSESSING THE EFFICIENCY OF CONSTRUCTED PHAGE-BASED BIOSORBENT" JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, BASINGSTOKE, GB, Bd. 25, Nr. 5, November 2000 (2000-11), Seiten 273-275, XP008016601 ISSN: 1367-5435</p> <p>-----</p>	1-15

# INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/002778

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument			Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung	
WO 2004001418	A	31-12-2003	DE	10228133	A1		22-01-2004	
			DE	10307793	A1		02-09-2004	
			AU	2003250270	A1		06-01-2004	
			CA	2490467	A1		31-12-2003	
			WO	2004001418	A2		31-12-2003	
			DE	10393326	D2		02-06-2005	
			EP	1516188	A2		23-03-2005	
WO 03000888	A	03-01-2003	DE	10129815	A1		09-01-2003	
			CA	2450572	A1		03-01-2003	
			WO	03000888	A2		03-01-2003	
			EP	1399551	A2		24-03-2004	
			US	2004248298	A1		09-12-2004	
US 6436653	B1	20-08-2002	US	2002128381	A1		12-09-2002	
			AU	1650100	A		03-07-2000	
			BR	9916330	A		11-09-2001	
			CA	2355292	A1		22-06-2000	
			CN	1335936	A		13-02-2002	
			WO	0036419	A1		22-06-2000	
			EP	1141718	A1		10-10-2001	
			JP	2002532719	T		02-10-2002	
			MX	PA01006106	A		21-07-2003	
			NZ	512295	A		25-07-2003	